

Dorota Lesiak¹, Agnieszka Brzozowska¹,
Krystyna Bienkowska-Szewczyk¹, Andrea D. Lipińska^{1*}

Zakład Biologii Molekularnej Wirusów, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Wpłynęło w maju 2013 r.

1. Wstęp. 2. US3 a uwalnianie kapsydów z jądra komórkowego. 3. Wpływ US3 na ekspresję genów. 4. Wpływ kinazy US3 na cytoszkielet komórki. 5. Rola kinazy US3 w blokowaniu apoptozy. 6. Właściwości immunomodulacyjne białka US3. 6.1. Oddziaływanie z systemami interferonów. 6.2. Wpływ na prezentację antygenów w kontekście cząsteczek MHC klasy I i inaktywacja limfocytów T cytotoksycznych. 6.3. Redukcja ekspresji antygenów wirusowych na powierzchni komórki. 6.4. Wpływ na aktywację limfocytów NKT. 7. Inne funkcje kinazy US3. 8. Podsumowanie

US3 – a multifunctional serine-threonine kinase of alphaherpesviruses

Abstract: Phosphorylation by protein kinases modulates the function of target proteins by interfering with their enzymatic activity, cellular location and/or association with other proteins. Viruses have evolved complex interactions with their hosts and often mimic cellular proteins in order to usurp the cellular machinery for their own benefit, so it is not surprising that vast number of viruses encode protein kinases. Alphaherpesvirus kinase US3 is a conserved multifunctional protein, regulating the egress of viral particles, but also responsible for alterations in cell morphology resulting from the breakdown of actin stress fibers and formation of cell projections. US3 homologs control the trafficking of viral and cellular proteins and inhibit apoptosis. The current review provides an overview of the properties and functions of alphaherpesvirus US3 protein kinase orthologues.

1. Introduction. 2. US3 and the virus egress from the cell nucleus. 3. Effect of US3 on gene expression. 4. Effect of US3 on cytoskeleton. 5. Role of US3 in the blocking of apoptosis. 6. Immunomodulatory properties of US3. 6.1. Interactions with the interferon systems. 6.2. Effect on the MHC class I-restricted antigen presentation and inactivation of cytotoxic T lymphocytes. 6.3. Reduction in the cell surface expression of viral antigens. 6.4. Effect on the activation of NKT lymphocytes. 7. Other functions of US3 kinase. 8. Summary

Słowa kluczowe: US3, herpeswirus, kinaza serynowo-treoninowa
Key words: US3, herpesvirus, serine-threonine kinase

1. Wstęp

Rodzina *Herpesviridae* obejmuje ponad dwieście gatunków wirusów o bardzo szerokim spektrum gospodarzy, głównie kręgowców. Według najnowszej systematyki herpeswirusów rodzina *Herpesviridae* współtworzy rząd *Herpesvirales* wraz z dwiema innymi rodzinami: *Alloherpesviridae*, która skupia wirusy zakażające ryby i płazy, oraz *Malacoherpesviridae*, skupiającą wirusy infekujące mięczaki [17]. Osiem spośród zidentyfikowanych dotychczas gatunków herpeswirusów stanowią wirusy patogenne dla ludzi. Herpeswirusy mają wiele cech wspólnych. Są to duże wirusy posiadające osłonkę, tegument i ikozaedralny kapsyd, a ich materiał genetyczny występuje w formie dwuniciowego DNA o wielkości 125–290 tysięcy par zasad [79]. Na podstawie istniejących różnic w tropizmie, składzie i organizacji genomu rodzina *Herpesviridae* została podzielona na trzy podrodziny: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* i *Gammaherpesvirinae* [17].

Największą podrodziną herpeswirusów są alfa herpeswirusy. Tak jak inne wirusy z tej rodziny, są one zdolne do przechodzenia w stan latencji, czyli infekcji utajonej w organizmie swojego naturalnego gospodarza. Reaktywacja ze stanu latencji pod wpływem specyficznego czynnika, często związanego ze stresem oraz/lub osłabieniem systemu odpornościowego, może doprowadzić do nawrotu objawów chorobowych [3]. Zidentyfikowano trzy alfa herpeswirusy ludzkie: ludzki herpeswirus 1 (HHV-1; nazwa zwyczajowa: wirus opryszczki typu 1, herpes simplex virus type 1, HSV-1), ludzki herpeswirus 2 (HHV-2; nazwa zwyczajowa: wirus opryszczki typu 2, herpes simplex virus type 2, HSV-2) oraz ludzki herpeswirus 3 (HHV-3; nazwa zwyczajowa: wirus ospy wietrznej i półpaśca, varicella zoster virus, VZV) [17]. Wirusy HSV-1 i HSV-2 są kojarzone głównie z opryszczką wargową i narządów płciowych, ale czasem mogą również prowadzić do powikłań, w tym zapalenia mózgu, zapalenia rogówki i ślepoty. Wirus VZV jest czynnikiem wywołującym ospę wietrzną,

* Autor korespondencyjny: Zakład Biologii Molekularnej Wirusów, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; tel. (58) 5236382; e-mail: andrea@biotech.ug.gda.pl

Tabela I

Ogólne cechy budowy ortologów kinazy US3 alfa herpeswirusów
[na podstawie sekwencji białek z bazy NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>].

Cecha Wirus	Numer referencyjny NCBI	Liczba reszt aminokwasowych	Pozycja domeny katalitycznej w sekwencji aa	Liczba izoform, w których występuje białko
HSV-1	NP_044665.1	481	200–374	2
HSV-2	NP_044533.1	481	200–398	1
PRV	YP_068384.2	390	59–233	2
VZV	NP_040188.1	393	102–275	1
BHV-1	NP_045368.1	468	165–463	1
BHV-5	YP_003662531.1	444	153–325	1
MDV	YP_001034009.1	402	108–318	1

a podczas reaktywacji ze stanu latencji może powodować półpaśca. Do podrodziny alfa herpeswirusów należy również kilka patogenów o znaczeniu weterynaryjnym, bardzo ważnych z ekonomicznego punktu widzenia. Wirus pseudowścieklizny (pseudorabies virus, PRV) jest czynnikiem zakaźnym wywołującym u świń chorobę Aujeszkego. Bydłęcy herpeswirus typu 1 (bovine herpesvirus type 1, BHV-1) powoduje zakaźne zapalenie nosa i tchawicy lub narządów płciowych u bydła, a także może być przyczyną poronień. Koński herpeswirus typu 1 (equine herpesvirus type 1, EHV-1) może powodować u zakażonych zwierząt choroby układu oddechowego, paraliż i poronienia. Wirus choroby Mareka (Marek's disease virus, MDV) powoduje śmiertelne infekcje u drobiu i, co jest dość nietypowe dla alfa herpeswirusów, należy do wirusów onkogennych [65].

Białka herpeswirusów mogą ulegać różnorodnym modyfikacjom ko- i posttranslacyjnym, takim jak glikozylacja, acylacja, sumoilacja, jednak najczęstszą spotykaną modyfikacją jest fosforylacja. Procesy fosforylacji-defosforylacji kontrolują prawie wszystkie aspekty funkcjonowania komórki: odgrywają kluczową rolę w kaskadach przekazywania sygnału oraz regulują wiele procesów komórkowych, m.in. wzrost, proliferację, różnicowanie, ekspresję genów, zmiany morfologii, czy apoptozę. Na poziomie molekularnym fosforylacja może zmieniać aktywność enzymatyczną modyfikowanego białka oraz jego strukturę przestrzenną, może również wpływać na transport białka do konkretnego kompartmentu komórkowego lub regulować oddziaływanie z partnerami białkowymi i niebiałkowymi [14]. Proces fosforylacji katalizowany jest przez enzymy zwane kinazami. Nieprawidłowe funkcjonowanie kinaz może prowadzić do powstawania chorób immunologicznych, nowotworów, zaburzeń metabolicznych i innych schorzeń.

Genomy herpeswirusów kodują jedną kinazę białkową konserwowaną w obrębie całej rodziny, jej ortologi noszą nazwy: UL13 u alfa herpeswirusów, UL97 u beta herpeswirusa – ludzkiego cytomegalowirusa (human

cytomegalovirus, HCMV), BGLF4 u należącego do gamma herpeswirusów wirusa Epsteina-Barr (EBV). Oprócz tej kinazy w poszczególnych podrodzinach *Herpesviridae* występują inne enzymy wirusowe o aktywności kinazowej. W latach osiemdziesiątych XX wieku w genomach różnych alfa herpeswirusów zidentyfikowano gen kodujący białko o sekwencji homologicznej do kinaz białkowych organizmów eukariotycznych i retrowirusów [59]. Homologi te w istocie okazały się posiadać aktywność kinazy serynowo-treoninowej, silnie konserwowaną w obrębie podrodziny *Alphaherpesvirinae* [31]. U większości alfa herpeswirusów ortologi tego białka noszą nazwę US3, która odnosi się do pozycji kodującego go genu w rejonie unikalnym krótkim (unique short, Us) genomu wirusa HSV-1. Wyjątek stanowi wirus VZV, u którego białko to określa się jako ORF66. Co ciekawe, nie zaobserwowano istnienia homologów kinazy US3 w genomach podrodzin *Beta-* i *Gammaherpesvirinae*. W genomie betaherpeswirusów występuje białko o nazwie US3, jednak jest to białko błonowe, nie wykazujące homologii do kinazy alfa herpeswirusów i posiadające inne właściwości [41].

Geny kodujące białko US3 u wirusów HSV-1 i PRV posiadają dwa miejsca startu transkrypcji, co za tym idzie, białko US3 występuje u nich w postaci dwóch izoform, określanymi jako US3/US3.5 u HSV-1 i US3a/US3b u PRV (Tabela I) [11, 71]. Obie postaci białka US3 posiadają aktywność kinazową, ale wydają się różnić swoim udziałem w niektórych procesach komórkowych i cyklu życiowym wirusów [69]. U HSV-1 dominuje dłuższa forma kinazy, natomiast u wirusa PRV US3a stanowi jedynie 5% białka, a obie izoformy różnią się lokalizacją wewnątrzkomórkową [11].

Ortologi kinazy US3 posiadają domenę kinazową o długości 280–300 reszt aminokwasowych (Tabela I), o architekturze charakterystycznej dla eukariotycznych kinaz białkowych. Domena ta, w której występują charakterystyczne, silnie konserwowane reszty aminokwasowe, zbudowana jest z dwunastu mniejszych subdomen zawierających miejsce wiązania ATP oraz miejsce

aktywne katalitycznie. W wiązaniu ATP kluczową rolę pełni konserwowana reszta lizyny w subdomenie II, natomiast konserwowana reszta kwasu asparaginowego znajdująca się w subdomenie VIB jest krytyczna dla aktywności katalitycznej [34]. Podobieństwo sekwencji aminokwasowej domen kinazowych wśród ortologów US3 jest znacznie wyższe niż w przypadku pełnej sekwencji białka US3 [19].

Mutacje wyżej wspomnianych konserwowanych reszt aminokwasowych powodują zniesienie aktywności kinazowej białka. Dla aktywności kinazy US3 BHV-1 kluczowe są dwie reszty lizyny, K282 w miejscu aktywności katalitycznej [10, 52] oraz K195 w obrębie pętli wiążącej ATP [52]. Dla BHV-5 istotna jest reszta lizyny 261 [53], dla HSV-1 reszta lizyny K220 [46, 80], a dla HSV-2 również reszta lizyny K220 [60] oraz reszta kwasu asparaginowego D305 [30]. U MDV, podobnie jak u wirusów HSV-1 i HSV-2, ważna katalitycznie jest reszta lizyny K220 [82], a dla PRV lizyna K136 i reszta kwasu asparaginowego D223 [95]. Poznanie tych reszt pozwoliło na skonstruowanie mutantów kinazowo-nieczynnych (*kinase-dead*), u których poprzez wprowadzenie mutacji punktowych w miejscach kodujących wymienione reszty aminokwasowe białko traci swoje właściwości kinazowe.

Opisano minimalną sekwencję konsensusową, która powinna znajdować się w obrębie substratu kinazy US3 i przedstawia się ją jako: (R)_n-X-(S/T)-Z-Z, gdzie $n \geq 2$, „S/T” oznacza fosforylowaną resztę seryny lub treoniny, X może być resztą dowolnego aminokwasu, choć preferencyjnie to reszta argininy, alaniny, waliny, proliny lub seryny (aminokwas ten może być w ogóle nieobecny), a Z może być resztą dowolnego aminokwasu oprócz proliny i reszty aminokwasów kwaśnych. W sekwencji optymalnej aminokwas X musi być obecny, a liczba $n \geq 3$. Rozpoznawana sekwencja docelowa jest bardzo podobna dla wirusów PRV, HSV-1, HSV-2 i VZV, a także komórkowej kinazy białkowej A (PKA) [19].

Białko US3, choć nie jest niezbędne do replikacji wirusa w hodowlach komórkowych *in vitro* [72, 88], pełni bardzo istotne funkcje w wirusowym cyklu życiowym, między innymi właśnie poprzez fosforylację specyficznych substratów wirusowych i komórkowych. Wykazano istnienie wielu możliwych substratów fosforylacji przez US3, jednak tylko dla kilku z nich pokazano istotne znaczenie biologiczne tej modyfikacji. Białko US3 wirusa HSV-1 zdolne jest do bezpośredniej fosforylacji komórkowego białka Bad [12, 46], laminy A/C i emeryny [61, 62], a także wirusowych białek ICP22 [46, 73] i gB [37, 94]. Wirusowe białka UL31 i UL34 są fosforylowane przez kinazę US3 HSV-1 i PRV [46, 49, 63, 74], a białko UL47 jest fosforylowane przez US3 HSV-1 [44] oraz BHV-1 [51]. Ponadto dla US3 wirusa PRV pokazano, że kinaza ta fosforyluje grupę A kinaz aktywowanych przez białko p21 (*group A p21-activated*

kinases, PAKs) [96]. Potwierdzonym substratem US3 wirusa VZV jest białko wirusowe IE62, będące głównym białkiem regulującym transkrypcję i głównym składnikiem tegumentu VZV [22].

Aktywność katalityczna US3 jest regulowana na drodze fosforylacji przez inne kinazy lub przez autofosforylację. Miejscem autofosforylacji US3 wirusa HSV-1 jest reszta seryny w pozycji 147. Pokazano, że mutacja S147A (substytucja reszty seryny w pozycji 147 peptydu US3 HSV-1 przez resztę alaniny) wpływa na lokalizację US3 w zainfekowanej komórce oraz na jego funkcjonalność [45]. W sekwencji US3 wirusa HSV-2 reszcie seryny 147 odpowiada reszta kwasu asparaginowego, która również ma istotne znaczenie dla aktywności kinazowej białka [60]. Autofosforylację zaobserwowano jeszcze dla US3 wirusa BHV-1, jednak miejsce autofosforylacji nie zostało zdefiniowane [52, 88]. US3 HSV-1 jest substratem dla innej kinazy wirusowej – UL13 [47].

Kinaza US3 fosforyluje wiele białek, zarówno komórkowych jak i wirusowych, o różnej lokalizacji w komórce, co sugeruje, że wewnątrzkomórkowa lokalizacja kinazy musi determinować jej właściwości. Udało się pokazać, że podczas infekcji HSV-1 białko US3 krąży między jądrem a cytoplazmą [62, 78, 96]. Również US3 HSV-2 może docierać do swych substratów znajdujących się zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie, dzięki swoistemu transportowi jądrowo-cytoplazmatycznemu (*nuclear shuttling*). Obecny model tego transportu zakłada, że import US3 wirusa HSV-2 do jądra zachodzi przez wewnętrzne niekanoniczne sygnały lokalizacji jądrowej (*nuclear localization signal, NLS*) lub przez interakcję z białkiem komórkowym niosącym NLS. Natomiast w eksporcie US3 z jądra pośredniczą bogate w reszty leucyny sygnały NES (*nuclear export signal*), które mogą znajdować się w sekwencji aminokwasowej w obrębie reszt 242–259 [30]. W sekwencjach innych ortologów US3 zlokalizowano obecność potencjalnych regionów NES i choć ich sekwencja aminokwasowa jest zmienna, hydrofobowe reszty aminokwasowe znajdujące się na początku pierwszego potencjalnego sygnału i na końcu drugiego potencjalnego NES są wysoce konserwowane [30, 53].

W przypadku US3 HSV-2 pokazano, że zatrzymanie białka w jądrze ogranicza proces tworzenia wypustek komórkowych [29, 30]. Świadczy to o tym, jak ważna dla pełnionych przez US3 funkcji jest jego lokalizacja i możliwość poruszania się pomiędzy jądrem a cytoplazmą komórki.

Jak wcześniej wspomniano, gen US3 wirusa PRV koduje dwa białka: formę długą US3a oraz formę krótką US3b. Zasadniczą różnicą między tymi formami białka jest obecność fragmentu o długości 54 reszt aminokwasowych na N-końcu US3a. Choć obie formy US3 PRV posiadają zarówno sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), jak i błonowej, to w komórkach transfekowanych forma

długa lokalizuje się głównie w błonie komórkowej/pęcherzykach wewnątrzkomórkowych a forma krótka w jądrze. Wykazano, że ów fragment dodatkowych 54 reszt aminokwasowych US3a zawiera dodatkowy sygnał lokalizacji mitochondrialnej (*mitochondria targeting sequence*, MTS). Obecność MTS wpływa na lokalizację długiej formy białka, natomiast w jego nieobecności znaczenie dominujące wydaje się mieć NLS, dlatego US3b znajdowane jest przede wszystkim w jądrze komórkowym [11]. Lokalizacja obu form US3 ma znaczenie dla takich ich funkcji, jak blokowanie apoptozy czy formowanie wypustek komórkowych [11, 27].

US3 jest białkiem wielofunkcyjnym, wymagającym na wielu etapach infekcji wirusowej, m.in. w czasie wyjścia kapsydów z jądra komórkowego. Ponadto US3 jest zdolne do blokowania apoptozy, modulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza, a także indukowania zmian w cytoskieletcie komórki. Niektóre funkcje są konserwowane w obrębie podrodziny *Alphaherpesvirinae*, podczas gdy inne zdają się być unikalne dla poszczególnych ortologów. Aktywność kinazowa US3 wydaje się być kluczowa dla większości funkcji tego białka.

2. US3 a uwalnianie kapsydów z jądra komórkowego i morfogeneza wirionów

Kinaza US3 pełni ważne funkcje na różnych etapach ścieżki uwalniania wirionów potomnych z jądra komórkowego do cytoplazmy. Zaobserwowano, że procesy te zachodzą w nieobecności US3 z obniżoną wydajnością. Podejrzewa się, że kinazy komórkowe rekompensują nieobecność US3 w stopniu wystarczającym do zajścia wymienionych procesów. Sam proces wyjścia wirionów alfa herpeswirusów z jądra jest kilkietapowy. Nukleokapsydy nabywają osłonkę pierwotną podczas tzw. wpączkowania do wewnętrznej błony jądrowej. Następnie zachodzi fuzja osłonki pierwotnej z zewnętrzną błoną jądrową, co prowadzi do uwolnienia wirionów potomnych do cytoplazmy. Aby tak się stało, kapsydy wirusowe muszą najpierw pokonać barierę, jaką stanowi jądrowa sieć lamin A/C i B ze związaną z nimi emeryną. Sieć ta jest zbyt gęsta, aby wiriony mogły swobodnie przez nią przenikać. Te kluczowe elementy jądrowej sieci lamin mogą być fosforylowane przez kinazę US3 wirusa HSV-1. Prowadzi to do zmiany ich lokalizacji i rozluźnienia tworzonej przez nie sieci, co pozwala nukleokapsydom dotrzeć do wewnętrznej błony jądrowej [54, 61, 62].

Podczas procesu wyjścia wirionów z jądra komórkowego ważną rolę odgrywają wirusowe białka UL31 i UL34. Białka te tworzą kompleks zaangażowany w kontakt wirionu z błoną jądrową poprzez jego wiązanie się z laminami A/C oraz B. Fosforylacja obu tych białek przez kinazę US3 HSV-1 i PRV jest niezbędna do właściwego rozmieszczenia kompleksu UL31/UL34

w błonie jądrowej [47, 49, 76]. Jądrowa lokalizacja kompleksu wydaje się być regulowana głównie przez fosforylację N-końca białka UL31 [63]. Pokazano, że ważną rolę w oddziaływaniu US3 na UL31/UL34 pełni fosforylacja US3 przez wirusową kinazę UL13. W przypadku wirusa PRV kinaza US3 nie fosforyluje UL34, a w przypadku VZV nie udowodniono żadnej roli ORF66 w wyjściu wirionów z jądra [81].

Białka UL31, UL34 i US3 są charakterystycznymi składnikami tzw. wirionów pierwotnych. US3 wirusów HSV-1, PRV i MDV, ale nie VZV, jest potrzebne również do utraty osłonki pierwotnej przez wiriony podczas ich fuzji z zewnętrzną błoną jądrową (tzw. zjawiska de-envelopment) – tu również bardzo ważna jest aktywność kinazowa US3. Pokazano, że skutkiem delekcji genu US3 tych wirusów są nieprawidłowości w postaci akumulacji niedojrzałych wirionów wirusowych w przestrzeni okołojądrowej [76, 80, 82, 83, 90], co sugeruje konserwowaną rolę US3 podczas wyjścia wirionów z jądra. Jednak ilość zewnątrzkomórkowych wirionów jest tylko częściowo zredukowana w nieobecności US3, więc ten defekt w eksporcie jądrowym nie jest całkowity.

Innymi białkami wirusowymi, ważnymi na etapach wyjścia wirusa z jądra komórki, są glikoproteiny gB i gH. U HSV-1 białka te prawdopodobnie są zaangażowane w fuzję pierwotnej osłonki wirusa znajdującego się w przestrzeni okołojądrowej z zewnętrzną błoną jądrową [25, 94]. W przypadku HSV-1 kinaza US3 fosforyluje domenę cytoplazmatyczną gB w miejscu Thr 887, co najpewniej inicjuje proces fuzji [25, 37, 94]. Ta funkcja US3 może nie być konserwowana wśród alfa herpeswirusów, ponieważ u wirusa PRV zarówno białko gB, jak i gH, nie są wykrywane w błonach jądrowych i raczej nie odgrywają one roli w czasie wyjścia wirionów z jądra [33, 48].

3. Wpływ US3 na ekspresję genów

Deacetylazy histonowe 1 i 2 (HDAC1 i HDAC2) odpowiadają za procesy deacetylacji reszt lizyny w ogonach histonów rdzeniowych, co skutkuje zablokowaniem rearanżacji struktur chromatynowych i zahamowaniem ekspresji genów. Inhibicja aktywności enzymatycznej deacetylaz skutkuje hiperacetylacją histonów i zmianą konformacji nukleosomu, co umożliwia wiązanie się transkrypcyjnych białek regulatorowych do matrycy DNA i wydajną transkrypcję [87]. Herpeswirusy posiadają zdolność modyfikowania tej drogi regulacji ekspresji genów. Dla ortologów białka US3 wirusów HSV-1, HSV-2, PRV oraz VZV odnotowano zdolność do hiperfosforylacji deacetylaz HDAC1 i HDAC2 [45, 60, 70, 92]. Ta właściwość kinazy US3 pozwala na zahamowanie deacetylacji histonów i wzmożoną ekspresję genów wirusowych. Jednak pomimo tej funkcjonalnej zgodności zaob-

serwowano również różnice pomiędzy ortologami US3. Badania *in vitro* pokazały, że US3 wirusa VZV fosforyluje HDAC1 i HDAC2 pośrednio. Prawdopodobnie to kinaza wirusowa aktywuje przez fosforylację kinazy komórkowe, które fosforylują deacetylasy [91]. W przypadku wirusa PRV hiperfosforylację HDAC2 obserwowano również podczas zakażenia komórek wirusem pozbawionym genu US3, odmiennie od obserwacji dla wirusów HSV-1 i VZV, gdzie białko US3 jest konieczne do zajęcia hiperfosforylacji deacetylaz histonowych. Wyniki te sugerują istnienie specyficznego dla PRV, US3-niezależnego mechanizmu hiperfosforylacji HDAC. Ponadto w przypadku mutantów PRV i VZV nieposiadających białka US3 zahamowanie aktywności białek HDAC skutkuje powstawaniem większej liczby łysinek wirusowych. Przeciwny efekt obserwujemy w przypadku zakażenia mutantem HSV-1 Δ US3. To podkreśla istnienie znaczących funkcjonalnych różnic w modyfikacji HDAC przez kinazę US3 różnych wirusów [91, 92].

Zbadano również wpływ US3 VZV na wirusowe białko IE62 – główne białko tegumentu i czynnik regulujący transkrypcję. Kinaza US3 bezpośrednio fosforyluje białko IE62, regulując wewnątrzkomórkową lokalizację tego białka. Fosforylowane IE62 akumuluje się w cytoplazmie, gdzie zostaje włączone do nowopowstałych wirionów. W ten sposób US3 zahamowuje import IE62 do jądra, wpływając na regulację kaskady ekspresji genów wirusowych [22, 24].

Wykazano, że kinaza US3 wirusa PRV wpływa na poziom ekspresji przynajmniej trzech genów kodujących białka wirusowe. W komórkach infekowanych „dzikim” typem wirusa PRV obecność US3 wpływa na zwiększenie poziomu głównego białka wiążącego DNA – UL29 oraz dużej podjednostki reduktazy rybonukleotydowej UL39, ale zmniejsza poziom UL42 – białka pomocniczego polimerazy DNA. Efektu tego nie obserwuje się w komórkach zakażonych mutantem pozbawionym genu US3. Dane te mogą wskazywać na rolę US3 w metabolizmie DNA wirusowego [85].

4. Wpływ kinazy US3 na cytoszkielet komórki

Jedną z najciekawszych właściwości kinazy US3 jest jej wpływ na cytoszkielet i morfologię komórki. Kinaza US3 wirusów BHV-1, BHV-5, HSV-2, MDV i PRV indukuje drastyczne zmiany w cytoszkiecie komórkowym, mające związek ze zwiększonym rozprzestrzenianiem się wirusa pomiędzy komórkami [10, 27, 30, 53, 82, 83, 98]. Podczas infekcji następuje rozpad aktynowych włókien naprężeniowych, komórka przyjmuje zaokrąglony kształt i formowane są wypustki zbudowane z aktyny i mikrotubul. W przypadku infekcji wirusem PRV pokazano, że obecność białka US3 jest kluczowa dla powstawania tych połączeń. Co więcej,

wirus wykorzystuje wytworzone połączenia do zakażenia sąsiednich komórek [27]. Obserwowane modyfikacje cytoszkieletu są konsekwencją oddziaływań US3 z białkami z rodziny GTPaz Rho, regulujących stopień polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny oraz poziom fosforylacji miozyny. W pierwszym doniesieniu postawiono hipotezę, że US3 może wpływać na cytoszkielet aktynowy oddziałując na szlaki sygnałowe zależne od białka p21 (Cdc42/Rac1) [64]. W późniejszym czasie zidentyfikowano kinazy PAK1 i PAK2 (z grupy A kinaz aktywowanych przez białko p21, *group A p21-activated kinases*, PAKs), jako krytyczne efekторы szlaku sygnałowego Cdc42/Rac1 modyfikowane przez US3 [96]. Aktywacja kinaz PAK indukuje podobne rearanżacje aktyny, jakie obserwuje się przy ekspresji genu białka US3. US3 PRV fosforyluje i tym samym aktywuje zarówno PAK1, jak i PAK2. Fosforylacja PAK2 wpływa na zanik włókien naprężeniowych i zaokrąglanie komórek, podczas gdy bezpośrednia fosforylacja kinazy PAK1 przez US3 jest związana z tworzeniem wypustek komórkowych [96]. Efekt reorganizacji cytoszkieletu i tworzenia się wypustek komórkowych pod wpływem US3 jest analogiczny do uzyskiwanego w wyniku inhibicji kaskady sygnałowej GTPazy Rho przez specyficzne syntetyczne inhibitory, takie jak Y27632, w nieinfekowanych komórkach [38]. Z drugiej strony, stabilizacja F-aktyny przez jasplakinolid zapobiega tworzeniu się wypustek komórkowych w trakcie zakażenia PRV i hamuje rozprzestrzenianie się wirusa [27]. Ostatnie doniesienie dotyczące wpływu US3 wirusa PRV na cytoszkielet pokazuje, że białko to przyczynia się do defosforylacji, i tym samym aktywacji, kofiliny – niskocząsteczkowego białka będącego niezwykle ważnym regulatorem stabilności filamentów aktynowych. Obecność fosforylowanej kofiliny wiąże się z zahamowaniem zdolności US3 do pośredniczenia w formowaniu się wypustek i zaokrąglaniu komórki [39].

Aktywność kinazowa różnych ortologów US3 jest czynnikiem warunkującym zajście wyżej opisanych zmian w komórce. Wyjątek stanowi białko US3 wirusa MDV, którego zmutowana forma pozbawiona aktywności kinazowej nadal jest zdolna do indukowania zmian w cytoszkiecie komórki [82]. Natomiast w przypadku BHV-5 aktywność kinazowa jest potrzebna do zaindukowania tworzenia wypustek, ale nie jest konieczna, aby nastąpiła depolimeryzacja aktynowych włókien naprężeniowych [53].

5. Rola US3 w blokowaniu apoptozy

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórkowa typu I, jest jednym z podstawowych procesów odpowiedzialnych za ograniczenie rozprzestrzeniania zakażeń wirusowych w organizmie. W odróżnieniu od innych procesów niszczenia komórek, apoptoza podlega ściśle

kontroli i nie wywołuje odczynu zapalnego [100]. Podczas infekcji wirusowej może dojść do apoptotycznej śmierci komórek na drodze bezpośredniej odpowiedzi na infekcję bądź też po rozpoznaniu zakażonych komórek przez limfocyty T cytotoksyczne lub komórki NK. Nie dziwi zatem fakt, że w celu obrony przed odpowiedzią antywirusową komórki, wirusy wykształciły mechanizmy blokowania procesu apoptozy.

Właściwości antyapoptotyczne zostały potwierdzone dla ortologów kinazy US3 wirusów HSV-1, HSV-2, PRV i MDV [2, 32, 35, 40, 56, 66, 82]. Kinaza US3 wpływa na proces apoptozy na wielu etapach. Najczęściej US3 fosforyluje białka proapoptotyczne obecne w komórce gospodarza, blokując ich aktywność i tym samym zapobiegając śmierci komórki. US3 HSV-1 fosforyluje prokaspazę 3, która jest głównym egzekutorem apoptozy, co skutkuje zablokowaniem jej cięcia proteolitycznego do formy aktywnej [6, 66]. Wykazano również, że US3 fosforyluje białka proapoptotyczne należące do rodziny Bcl-2: Bad i Bid [6, 13].

Kinaza US3 HSV-1 wpływa również na drogę apoptozy związaną z granzymem B. Granzym B jest proteazą serynową syntetyzowaną głównie przez limfocyty cytotoksyczne i komórki NK. Proteaza ta może indukować śmierć komórki zainfekowanej wirusem poprzez aktywację kaspazy 3 lub angażowanie białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2: Bid i Bax [89]. Na skutek cięcia proteolitycznego białka Bid przez granzym B powstaje skrócona forma tego białka, tzw. fragment tBid (*truncated Bid*, 14 kDa). tBid wnika do mitochondriów i rekrutuje białko Bax, co prowadzi do zmian konformacyjnych w białku Bax, wskutek których dochodzi do depolaryzacji błony mitochondrialnej i uwolnienie cytochromu c. Prowadzi to do dalszej aktywacji kaspaz i śmierci komórki [36]. US3 wirusa HSV-1 fosforyluje białko Bid, chroniąc je przed proteolityczną aktywacją przez granzym B. Zapobiega to lizie zakażonych komórek przez limfocyty cytotoksyczne [13]. Ponadto pokazano, że US3 HSV-1 chroni zakażone komórki przed apoptozą indukowaną UV oraz częściowo przed apoptozą indukowaną przez ligand Fas [40].

Jak wcześniej wspomniano, sekwencja aminokwasowa kinazy US3 jest wysoce podobna do sekwencji cAMP-zależnej komórkowej kinazy białkowej A (PKA) [55], enzymu bardzo istotnego dla regulowania metabolizmu komórki. Benetti i Roizman pokazali, że w komórkach zakażonych wirusem HSV-1 kinaza US3 może fosforylować nie tylko cząsteczki będące wspólnymi substratami PKA i US3, ale także reszty aminokwasowe obecne w podjednostce regulatorowej typu II (RII) PKA, co skutkuje zablokowaniem apoptozy komórek [4].

Stosunkowo niedawno wykazano, że białko US3 HSV-1 oddziałuje z komórkowym białkiem PDCD4 (*programmed cell death protein 4*). W komórkach infekowanych wirusem HSV-1 białko PDCD4 jest potran-

slacyjnie modyfikowane zarówno w sposób zależny, jak i niezależny od kinazy US3. Ponadto na skutek zakażenia następuje akumulacja PDCD4 w jądrze komórki, podczas gdy w normalnych warunkach białko to krąży między jądrem a cytoplazmą [93].

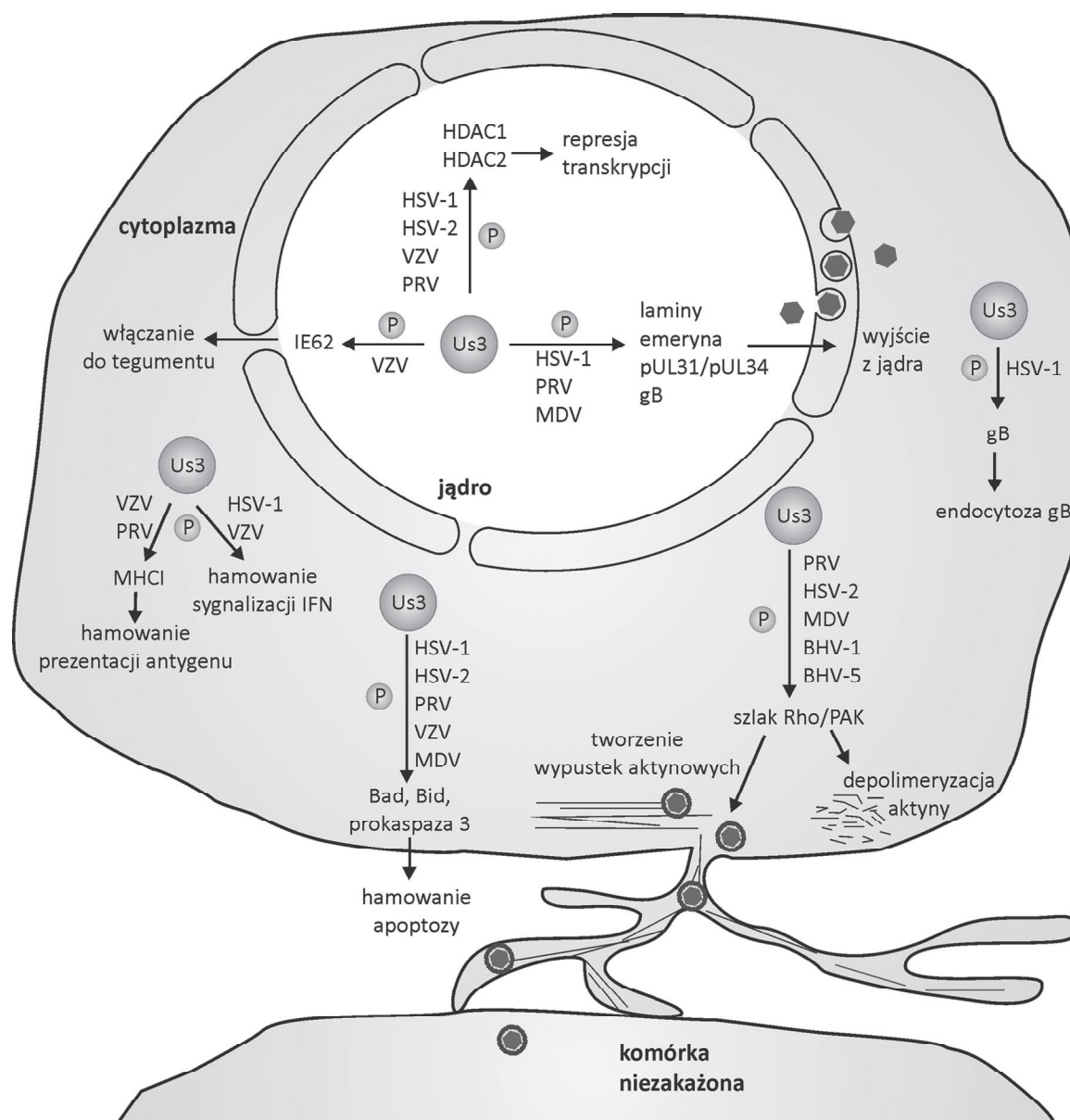
W przypadku US3 BHV-1 przez długi czas uważano, że w odróżnieniu od swych ortologów, białko to nie jest zdolne do blokowania apoptozy [88]. Chcąc sprawdzić, czy rzeczywiście kinaza BHV-1 nie posiada tej ważnej funkcji, Brzowska i wsp. zbadali, czy w komórkach zainfekowanych dzikim wirusem BHV-1 i wirusem z delecją genu US3 występuje aktywna kaspaza 3 [9]. Obecność US3 hamowała aktywację kaspazy 3 i indukcję apoptozy wywołanej infekcją wirusową oraz czynnikami egzogennymi, takimi jak staurosporyna czy sorbitol. Doświadczenia te pokazały, że białko US3 BHV-1 również posiada właściwości chroniące komórki przed śmiercią apoptotyczną. Właściwości antyapoptotyczne posiada również białko US3 blisko spokrewnionego wirusa BHV-5. Doświadczenia z wykorzystaniem mutantu K261D US3 BHV-5 pokazały, że funkcja ta zależna jest od aktywności kinazowej białka [53].

Zbadano również, czy opisywane wcześniej komórkowe kinazy PAK1 i PAK2, oprócz roli w rearanżacji cytoszkieletu, w czasie infekcji wirusowej mają związek z właściwościami antyapoptotycznymi US3. Obie kinazy PAK biorą udział w regulacji apoptozy. Aktywna kinaza PAK1 może fosforylować proapoptotyczne białko Bad, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, co prowadzi do inaktywacji Bad [84]. Natomiast PAK2, w zależności od mechanizmu aktywacji, może mieć właściwości anty-, jak i proapoptotyczne. Chociaż związek PAK1/2 i US3 wydaje się być oczywisty, ponieważ wszystkie trzy kinazy fosforylują Bad w zainfekowanych komórkach, a US3 modyfikuje dodatkowo kinazy PAK, doświadczenia z inhibitorem kinaz PAK i liniami komórek z wyciszoną ekspresją genów PAK wskazują jedynie na umiarkowane znaczenie tych kinaz dla pełnionych przez US3 funkcji związanych z blokowaniem śmierci komórki. Jedynie obecność PAK1 sprzyja właściwościom antyapoptotycznym US3, co tłumaczy się raczej synergistycznym, ale niezależnym działaniem obu kinaz na białko Bad [97].

Podsumowując, US3 poprzez swoją aktywność kinazową blokuje apoptozę wywołaną różnymi czynnikami, w tym samą infekcją herpeswirusową, działaniem cytotoksycznych limfocytów T, granzymem B, oraz czynnikami zewnętrznymi, takimi jak staurosporyna czy sorbitol.

6. Właściwości immunomodulacyjne białka US3

Przebieg infekcji wirusowej, w tym herpeswirusami, zależy od równowagi pomiędzy stanem immunokompetencji zakażonego organizmu oraz zdolności hamowania



Rys.1. Schemat podsumowujący różne funkcje kinazy US3 alfa herpeswirusów

przebiegu odpowiedzi immunologicznej przez patogen. Herpeswirusy są uważane za mistrzów „ucieczki” immunologicznej; kodują wiele białek immunomodulacyjnych, które potrafią hamować zarówno odpowiedź wrodzoną, jak i nabytą, praktycznie na wszystkich etapach.

6.1. Oddziaływanie z systemami interferonów

Produkcja interferonów typu I (IFN- α , IFN- β i IFN- ω), II (IFN- γ) i III (IFN- λ) stanowi jeden z głównych mechanizmów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Są to białka sekrecyjne, które wiążąc się ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek wpływają na uruchomienie spokrewnionych ze sobą kinazowych szlaków sygnałowych, określanych jako JAK/STAT (*Janus activated kinase/signal transducer and activator*

of transcription), indukujących mechanizmy obrony przeciwwirusowej. Aktywność interferonów zależy od tzw. interferonowych czynników regulacyjnych IRF (*interferon regulatory factors*), działających poprzez modulację ekspresji określonych genów. Efekt antywirusowy wywołany działaniem IFN może być bezpośredni – przez indukcję stanu przeciwwirusowego w sąsiednich komórkach lub pośredni – przez aktywację komórek układu odpornościowego.

Delecja genu US3 wirusa HSV-1 ma związek ze wzrostem wrażliwości wirusa na działanie IFN-. Pokazano, że produkcja cząstek wirusowych w komórkach zakażonych mutantem HSV-1 z delecją genu US3 ulega dramatycznej redukcji na skutek traktowania komórek IFN- α [68]. Wyniki te wskazują na udział kinazy US3 w omijaniu drogi odpowiedzi antywirusowej z udziałem IFN- α (Rys.1). Ponadto US3 HSV-1 fosforyluje

podjednostkę α receptora interferonu- γ , przez co może blokować ekspresję genów zależną od tej cytokiny [58]. Prawdopodobnie kinaza US3 moduluje również mechanizmy przeciwwirusowe z udziałem IFN- β , ponieważ zakażenie HSV-1 Δ US3 indukuje ekspresję IRF-3 i interferonu β . Białko US3 HSV-1 hamuje ekspresję receptora toll-podobnego 3 (TLR3) oraz białka MxA o właściwościach antywirusowych (*myxovirus resistance protein 1*, białko o aktywności GTPazy warunkujące odporność na zakażenie myksowirusami i wieloma innymi wirusami o genomach w postaci RNA) [67].

6.2. Wpływ na prezentowanie antygenów z udziałem cząsteczek MHC klasy I i aktywność cytotoksycznych limfocytów T

Jednym z najbardziej efektywnych komponentów odpowiedzi antywirusowej są cytotoksyczne limfocyty T. Wykrywają one infekcję wirusową poprzez rozpoznawanie białek wirusowych prezentowanych w kompleksach z białkami głównego układu zgodności tkankowej klasy I (*major histocompatibility complex class I*, MHC I) na powierzchni zainfekowanej komórki. Niektóre herpeswirusy potrafią modulować odpowiedź antywirusową na tym poziomie zmniejszając ilość MHC klasy I na powierzchni komórek.

Do tej pory właściwości immunomodulacyjne polegające na hamowaniu poziomu MHC klasy I wykazano przede wszystkim dla ORF66 wirusa VZV. Białko ORF66 VZV jest zdolne do hamowania MHC I na powierzchni zainfekowanych komórek oraz komórek transfekowanych plazmidami kodującymi ORF66. Aktywność kinazowa ORF66 jest konieczna dla hamowania MHC klasy I. Wykazano, że ORF66 wpływa na opóźnienie transportu kompleksu MHC I-peptyd z retikulum endoplazmatycznego do części *trans* aparatu Golgiego lub też na retencję cząsteczek MHC klasy I w samym aparacie Golgiego [1, 23]. Ponadto ORF66 może wpływać na procesy mające miejsce w ER, takie jak asocjacja łańcucha ciężkiego MHC klasy I z β 2-mikroglobuliną [23]. Przypuszczalnie wirus VZV koduje jeszcze inne białko/białka wpływające na obniżenie poziomu MHC klasy I niezależnie od US3 [23].

W przypadku kinazy US3 wirusa PRV pokazano, że białko to również może wpływać na poziom MHC I, jednak wydaje się, że jedynie w sposób pośredni i w określonym typie komórek. Obecność kinazy US3 PRV jest potrzebna, ale niewystarczająca, aby obniżyć poziom MHC klasy I na powierzchni komórek ST (*swine testicle*), natomiast zupełnie nie jest do tego potrzebna w komórkach PK-15 (*pig kidney*) czy komórkach PAM (*porcine alveolar macrophages*). W przeciwieństwie do US3 VZV, w komórkach transfekowanych plazmidem kodującym US3 PRV (a więc w nieobecności innych

białek wirusowych) nie następuje zahamowanie MHC, co może sugerować różny mechanizm działania tych ortologów. Doświadczenia pokazują, że US3 PRV jest zdolne do modulowania poziomu MHC klasy I jedynie w obecności innych białek wirusowych. Prawdopodobnie kinaza US3 PRV fosforyluje inne wirusowe białko/a oddziałujące z komórkowymi białkami związanymi z prezentacją antygenów przez MHC I lub fosforyluje białko/a komórkowe związane z działaniem MHC I, które w ufosforylowanej postaci może być blokowane przez inne białko wirusowe [20].

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na komórkach transdukowanych wektorem bakulowirusowym niosącym gen białka wirusa US3 BHV-1 oraz na komórkach infekowanych wirusem BHV-1 pokazują, że białko US3 BHV-1 także wpływa na poziom cząstek MHC klasy I na powierzchni komórek [57].

Podczas bezpośredniej transmisji cząstek wirusowych między komórkami na zasadzie tzw. *cell-to-cell spread* (bez uwalniania wirusa do środowiska zewnątrzkomórkowego) mogą być wysyłane sygnały, które będą wpływać na komórki takie jak NK (*natural killer cells*), LAK (*lymphokine-activated killer cells*) czy limfocyty T cytotoksyczne i hamować ich zdolność do zabijania zakażonych komórek [86, 99]. W komórkach zakażonych wirusem HSV-1 i HSV-2 zaobserwowano taką właśnie inaktywację komórek CTL, a ekspresja genu białka US3 jest niezbędna do transmisji sygnału inaktywującego [86].

6.3. Redukcja ekspresji antygenów wirusowych na powierzchni komórek

Endocytoza immunogennych białek, w tym glikoprotein wirusowych, z powierzchni zainfekowanej komórki jest kolejnym sposobem unikania odpowiedzi immunologicznej wykorzystywanym przez herpeswirusy. Endocytozie ulega kilka białek alfa herpeswirusów, w tym glikoproteiny gB, gD, gE/gI, gM, [8, 26]. Glikoproteina gB znajdująca się na powierzchni komórki stanowi potencjalny sygnał indukujący odpowiedź immunologiczną, np. komórek NK [7]. Jak wcześniej wspomniano, kinaza US3 HSV-1 fosforyluje domenę cytoplazmatyczną gB w miejscu Thr 887 [37, 94]. Fosforylacja ta wpływa nie tylko na lokalizację glikoproteiny B wewnątrz komórki oraz patogenезę HSV-1, ale także wpływa na obniżenie poziomu gB na powierzchni zainfekowanych komórek [43]. Podczas infekcji BHV-1 również obserwuje się zależny od obecności kinazy US3, obniżony poziom glikoproteiny gB, a także gD, na powierzchni komórek [57]. Endocytozę gB oraz gD zaobserwowano także w przypadku infekcji PRV, gdzie zjawiska te sprzyjają usuwaniu kompleksów antygen-przeciwciała z powierzchni zainfekowanych mono-

cytów. Jednak rola US3 w tym procesie nie jest jasna, ponieważ endocytoza glikoprotein gB i gD zachodzi również w nieobecności US3 [28].

6.4. Wpływ na aktywację limfocytów NKT

Komórki NKT (*natural killer T cells*) posiadają na swej powierzchni zarówno receptory limfocytów T, jak i receptory typowe dla komórek NK. Stanowią one jedną z głównych składowych wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Aktywowane podczas infekcji komórki NKT wydzielają duże ilości cytokin aktywujących limfocyty CD4+ typu Th1 i Th2. Komórkom NKT przypisuje się działanie przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, antybakteryjne oraz przeciwpasożytnicze [50]. Komórki NKT rozpoznają antygeny glikolipidowe związane z białkiem powierzchniowym CD1d, które pod względem budowy przypomina białko głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I, ale nie wykazuje polimorfizmu.

Podczas zakażenia wirusem HSV-1 komórek prezentujących antygen APC następuje gwałtowne i wydajne obniżenie poziomu CD1d, w rezultacie czego komórki te są gorzej rozpoznawane przez limfocyty NKT [75]. Zmniejszeniu ulega poziom białka CD1d powracającego po endocytozie na powierzchnię komórki. Pokazano, że wirusowa glikoproteina gB HSV-1 oddziałuje z CD1d w retikulum endoplazmatycznym i pozostaje z nim stabilnie związana. Jednak do wydajnego obniżenia poziomu CD1d potrzebne jest także białko US3. Ekspresja US3 prowadzi do zwiększenia poziomu gB w części *trans* aparatu Golgiego (TGN) oraz wzmacnia relokalizację zarówno gB, jak i CD1d, do tego właśnie kompartmentu komórki. Zarówno US3, jak i gB, są białkami niezbędnymi do wydajnego obniżenia prezentacji antygenów przez CD1d i zahamowania aktywacji komórek NKT [75].

7. Inne funkcje kinazy US3

Prócz wyżej omówionych funkcji białka US3 należy również wspomnieć jego wpływ na energetykę komórki. Otóż w efekcie infekcji wirusem HSV-1 obserwuje się nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondrialnego łańcucha oddechowego [18]. Zahamowanie całkowitego oddychania komórkowego jest efektem zablokowania mitochondrialnego łańcucha transportującego elektrony. Łańcuch ten złożony jest z kilku „ogniw”, którymi są kompleksy lipoproteinowe oznaczone numerami I, II, III i IV. Zbadano, iż zablokowanie tego łańcucha na skutek infekcji HSV-1 następuje między kompleksem II, czyli oksydoreduktazą bursztynian-CoQ, a kompleksem III, czyli oksydoreduktazą CoQH₂-cytochrom c. Dzieje się to w czasie tzw. fazy beta ekspresji genów

wirusowych, kiedy to zachodzi transkrypcja genów wczesnych białek wirusowych. Do tych białek należy kinaza US3. Dalsze doświadczenia pokazały, że mutant nieposiadający US3 nie był w stanie blokować mitochondrialnego transportu elektronów. Stąd wniosek, że białko US3 HSV-1 odpowiada za hamowanie oddychania mitochondrialnego w czasie infekcji [18].

Jak wspomniano wcześniej (rozdz. 5.) kinaza US3 HSV-1 jest zdolna do aktywowania komórkowej kinazy białkowej A (PKA). Późniejsze badania wskazują, że kinaza US3 wpływa także na kinazę fosfatydyloinozytolu (PI3K) oraz komórkową kinazę białkową B/Akt, będące składnikami antyapoptotycznego szlaku transdukcji sygnału [5]. W zdrowych, niezakażonych komórkach, aktywacja PKB/Akt stanowi główny element drogi blokowania apoptozy. W swoich badaniach Bennett i Roizman wykazali, że wcześniej w infekcji HSV-1 indukowana jest fosforylacja reszty aminokwasowej seryny 473 PKB/Akt, na drodze mechanizmu zależnego od PI3K. Zablockowanie PI3K indukowało apoptozę w niezakażonych komórkach lub zakażonych mutantem wirusowym HSV-1ΔUS3, ale nie w komórkach zakażonych dzikim wirusem. Następowala również redukcja gromadzenia się specyficznych białek wirusowych, w tym kinazy US3, ale zjawiska te nie miały istotnego wpływu na namnażanie się wirusa. W późniejszym czasie po infekcji całkowita ilość PKB/Akt spadała, a jej ufosforylowana forma zanikała w sposób zależny od obecności US3 i niezależny od białkowej fosfatazy 2A. Aktywacja PKA przy użyciu forskoliny, substancji pochodzenia roślinnego zwiększającej stężenie cyklicznego AMP w komórkach, nie powodowała znaczącej defosforylacji PKB/Akt. Przedstawione w tych badaniach wyniki są zgodne z modelem zakładającym, że PKB/Akt jest aktywowana wcześniej w infekcji i blokuje apoptozę w zainfekowanych komórkach zanim nastąpi akumulacja US3 oraz że PKB/Akt pozostaje w komórce i funkcjonuje jako białko antyapoptotyczne pod nieobecność US3, ale staje się zbędna lub nawet szkodliwa kiedy kinaza US3 zostaje zakumulowana w efektywnej ilości.

8. Podsumowanie

Obecność kinazy serynowo-treoninowej US3 jest cechą unikalną dla alfa herpeswirusów. Chociaż białko US3 należy do najlepiej poznanych kinaz białkowych herpeswirusów a jego właściwości są obiektem licznych badań, wiele mechanizmów działania US3 wciąż pozostaje niewyjaśnionych. Wielofunkcyjność kinazy US3 przejawia się w jej udziale w cyklu replikacyjnym wirusa, m.in. morfogenezie wirionów i ich uwalnianiu z komórki, czemu towarzyszy zaangażowanie w wiele procesów wpływających na samą zainfekowaną

komórkę i jej otoczenie, takich jak regulacja ekspresji genów, hamowanie apoptozy, rearanżacje cytoszkieletu, czy też modulacja powstawania odpowiedzi immunologicznej, zarówno wrodzonej, jak i nabytej. Aktywność kinazowa US3 jest niezbędna do pełnienia większości funkcji tego białka. Dzięki tym „dodatkowym” właściwościom, związanych z kontrolą procesów komórkowych, szczególnie takich jak rozprzestrzenianie się wirusa pomiędzy komórkami oraz przebieg odpowiedzi immunologicznej, można zaliczyć kinazę US3 do czynników wirulencji alfa herpeswirusów, obok białek takich jak ICP47 i ICP34.5.

Jedną z istotniejszych funkcji białka US3 może okazać się ta, jaką pełni ono w walce herpeswirusów z układem immunologicznym gospodarza, bowiem aktywność białek immunomodulacyjnych obniża skuteczność komercyjnych i testowanych szczepionek przeciw herpeswirusowych oraz herpeswirusów testowanych w terapii genowej i onkolitycznej [16]. Delecja genu US3 powinna poprawiać właściwości immunogenne szczepionek oraz redukować rozprzestrzenianie się wirusów szczepionkowych, a w przypadku wektorów onkolitycznych indukować apoptozę w komórkach nowotworowych i zwiększać neurowirulencję wektorów przeznaczonych do terapii nowotworów centralnego układu nerwowego. Już dziś testuje się wektory oparte na wirusie opryszczki HSV-2 pozbawione genu US3 jako potencjalne szczepionki [21]. Wektory onkolityczne mogą z kolei stanowić korzystne uzupełnienie radio- i chemioterapii. Jednym z przykładów zastosowania mutantu wirusowego HSV-1 pozbawionego genu białka US3 w wiroterapii onkolitycznej mogą być badania przeprowadzone na komórkach ludzkiego glejaka, w których testowano wektor z delecją genu US3 towarzyszącą mutacji w genie reduktazy rybonukleotydowej UL39 [42]. Biorąc pod uwagę fakt, iż kandydatami do stosowania w terapii onkolitycznej są również alfa herpeswirusy BHV-1 i EHV-1 [15, 77], poznanie właściwości ortologów kinazy US3 tych wirusów może przyczynić się do konstrukcji bardziej efektywnych wektorów.

Piśmiennictwo

1. Abendroth A., Lin I., Slobedman B., Ploegh H., Arvin A.M.: Varicella-zoster virus retains major histocompatibility complex class I proteins in the Golgi compartment of infected cells. *J. Virol.* **75**, 4878–4888 (2001)
2. Asano S., Honda T., Goshima F., Watanabe D., Miyake Y., Sugiura Y., Nishiyama Y.: US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 plays a role in protecting corneal epithelial cells from apoptosis in infected mice. *J. Gen. Virol.* **80**, 51–56 (1999)
3. Banks T.A., Rouse B.T.: Herpesviruses – immune escape artists? *Clin. Infect. Dis.* **14**, 933–41 (1992)
4. Benetti L., Roizman B.: Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9411–9416 (2004)
5. Benetti L., Roizman B.: Protein Kinase B/Akt Is Present in Activated Form throughout the Entire Replicative Cycle of Δ US3 Mutant Virus but Only at Early Times after Infection with Wild-Type Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* **80**, 3341–3348 (2006)
6. Benetti L., Roizman B.: In transduced cells, the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 precludes activation and induction of apoptosis by transfected procaspase 3. *J. Virol.* **81**, 10242–10248 (2007)
7. Bishop G.A., Glorioso J.C., Schwartz S.A.: Relationship between expression of herpes simplex virus glycoproteins and susceptibility of target cells to human natural killer activity. *J. Exp. Med.* **157**, 1544–1561 (1983)
8. Brideau A.D., Enquist L.W., Tirabassi R.S.: The role of virion membrane protein endocytosis in the herpesvirus life cycle. *J. Clin. Virol.* **17**, 69–82 (2000)
9. Brzowska A., Rychłowski M., Biekowska-Szewczyk K.: Glycoprotein gE and Us3 Kinase: Two Players in Cell-To-Cell Spread of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1). 36th International Herpesvirus Workshop Poster 33 (2011)
10. Brzowska A., Rychłowski M., Lipińska A.D., Biekowska-Szewczyk K.: Point mutations in BHV-1 US3 gene abolish its ability to induce cytoskeletal changes in various cell types. *Vet. Microbiol.* **143**, 8–13 (2010)
11. Calton C.M., Randall J.A., Adkins M.W., Banfield B.W.: The Pseudorabies Virus Serine/Threonine Kinase Us3 Contains Mitochondrial, Nuclear and Membrane Localization Signals. *Virus Genes*, **29**, 131–145 (2004)
12. Cartier A., Broberg E., Komai T., Henriksson M., Masucci M.G.: The herpes simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8T cell lysis by preventing the cleavage of Bid by granzyme B. *Cell Death Differ.* **10**, 1320–1328 (2003)
13. Cartier A., Komai T., Masucci M.G.: The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad. *Exp. Cell Res.* **291**, 242–250 (2003a)
14. Cohen P.: The regulation of protein function by multisite phosphorylation: a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 596–601 (2000)
15. Courchesne M.J., White M.C., Stanfield B.A., Frampton A.R.Jr.: Equine herpesvirus type 1-mediated oncolysis of human glioblastoma multiforme cells. *J. Virol.* **86**, 2882–2886 (2012)
16. Dasgupta G., Chentoufi A.A., Nesburn A.B., Wechsler S.L., BenMohamed L.: New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield. *Expert Rev. Vaccines*, **8**, 1023–1035 (2009)
17. Davison A.J.: Herpesvirus systematic. *Vet. Microbiol.* **143**, 52–69 (2010)
18. Derakhshan M., Willcocks M.M., Salako M.A., Kass G.E., Carter M.J.: Human herpesvirus 1 protein US3 induces an inhibition of mitochondrial electron transport. *J. Gen. Virol.* **87**, 2155–2159 (2006)
19. Deruelle M.J., Favoreel H.W.: Keep it in the subfamily: the conserved alphaherpesvirus US3 protein kinase. *J. Gen. Virol.* **92**, 18–30 (2011)
20. Deruelle M.J., Van den Broeke C., Nauwynck H.J., Mettenleiter T.C., Favoreel H.W.: Pseudorabies virus US3- and UL49.5-dependent and -independent downregulation of MHC I cell surface expression in different cell types. *Virology*, **395**, 172–181 (2009)
21. Diaz F., Knipe D.: US3 deletion and intramuscular inoculation increases dl5-29 vaccine efficacy. 37th International Herpesvirus Workshop Poster 6.28 (2012)
22. Eisfeld A.J., Turse S.E., Jackson S.A., Lerner E.C., Kinchington P.R.: Phosphorylation of the varicella-zoster virus (VZV)

- major transcriptional regulatory protein IE62 by the VZV open reading frame 66 protein kinase. *J. Virol.* **80**, 1710–1723 (2006)
23. Eisfeld A.J., Yee M.B., Erazo A., Abendroth A., Kinchington P.R.: Downregulation of class I major histocompatibility complex surface expression by varicella-zoster virus involves open reading frame 66 protein kinase-dependent and -independent mechanisms. *J. Virol.* **81**, 9034–9049 (2007)
 24. Erazo A., Kinchington P.R.: Varicella-zoster virus open reading frame 66 protein kinase and its relationship to alphaherpesvirus US3 kinases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **342**, 79–98 (2010)
 25. Farnsworth A., Wisner T.W., Webb M., Roller R., Cohen G., Eisenberg R., Johnson D.C.: Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10187–10192 (2007)
 26. Favoreel H.W., Nauwynck H.J., Halewyck H.M., Van Oostveldt P., Mettenleiter T.C., Pensaert M.B.: Antibody-induced endocytosis of viral glycoproteins and major histocompatibility complex class I on pseudorabies virus-infected monocytes. *J. Gen. Virol.* **80**, 1283–1291 (1999)
 27. 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)
 28. Ficiska J., Van Minnebruggen G., Nauwynck H.J., Biekowska-Szewczyk K., Favoreel H.W.: Pseudorabies virus glycoprotein gD contains a functional endocytosis motif that acts in concert with an endocytosis motif in gB to drive internalization of antibody-antigen complexes from the surface of infected monocytes. *J. Virol.* **79**, 7248–7254 (2005)
 29. Finnen R.L., Banfield B.W.: Subcellular localization of the alphaherpesvirus serine/threonine kinase Us3 as a determinant of Us3 function. *Virulence*, **1**, 291–294 (2010)
 30. Finnen R.L., Roy B.B., Zhang H., and Banfield B.W.: Analysis of filamentous process induction and nuclear localization properties of the HSV-2 serine/threonine kinase Us3. *Virology*, **397**, 23–33 (2010)
 31. Frame M.C., Purves F.C., McGeoch D.J., Marsden H.S., Leader D.P.: Identification of the herpes simplex virus protein kinase as the product of viral gene US3. *J. Gen. Virol.* **68**, 2699–2704 (1987)
 32. Geenen K., Favoreel H.W., Olsen L., Enquist L.W., Nauwynck H.J.: The pseudorabies virus US3 protein kinase possesses anti-apoptotic activity that protects cells from apoptosis during infection and after treatment with sorbitol or staurosporine. *Virol.* **331**, 144–150 (2005)
 33. Granzow H., Klupp B.G., Fuchs W., Veits J., Osterrieder N., Mettenleiter T.C.: Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J. Virol.* **75**, 3675–3684 (2001)
 34. Hanks S.K., Hunter T.: Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576–596 (1995)
 35. Hata S., Koyama A.H., Shiota H., Adachi A., Goshima F., Nishiyama Y.: Antiapoptotic activity of herpes simplex virus type 2: the role of US3 protein kinase gene. *Microbes Infect.* **1**, 601–607 (1999)
 36. Heibin J.A., Goping I.S., Barry M., Pinkoski M.J., Shore G.C., Green D.R., Bleackley R.C.: Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bcl-2 and bax. *J. Exp. Med.* **192**, 1391–1402 (2000)
 37. Imai T., Sagou K., Arii J., Kawaguchi Y.: Effects of phosphorylation of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein B by Us3 kinase in vivo and in vitro. *J. Virol.* **84**, 153–162 (2010)
 38. Ishizaki T., Uehata M., Tamechika I., Keel J., Nonomura K., Maekawa M., Narumiya S.: Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol. Pharmacol.* **57**, 976–983 (2000)
 39. Jacob T., Van den Broeke C., van Troys M., Waterschoot D., Ampe C., Favoreel H.W.: Alphaherpesviral US3 kinase induces cofilin dephosphorylation to reorganize the actin cytoskeleton. *J. Virol.* **87**, 4121–4126 (2013)
 40. Jerome K.R., Fox R., Chen Z., Sears A.E., Lee H., Corey L.: Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J. Virol.* **73**, 8950–8957 (1999)
 41. Jones T.R., Wiertz E.J., Sun L., Fish K.N., Nelson J.A., Ploegh H.L.: Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11327–11333 (1996)
 42. Kanai R., Wakimoto H., Martuza R.L., Rabkin S.D.: A novel oncolytic herpes simplex virus that synergizes with phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway inhibitors to target glioblastoma stem cells. *Clin. Cancer Res.* **17**, 3686–3696 (2011)
 43. Kato A., Arii J., Shiratori I., Akashi H., Arase H., Kawaguchi Y.: Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. *J. Virol.* **83**, 250–261 (2009)
 44. Kato A., Liu Z., Minowa A., Imai T., Tanaka M., Sugimoto K., Nishiyama Y., Arii J., Kawaguchi Y.: Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 and major tegument protein UL47 reciprocally regulate their subcellular localization in infected cells. *J. Virol.* **85**, 9599–9613 (2011)
 45. Kato A., Tanaka M., Yamamoto M., Asai R., Sata T., Nishiyama Y., Kawaguchi Y.: Identification of a physiological phosphorylation site of the herpes simplex virus 1-encoded protein kinase Us3 which regulates its optimal catalytic activity in vitro and influences its function in infected cells. *J. Virol.* **82**, 6172–6189 (2008)
 46. Kato A., Yamamoto M., Ohno T., Kodaira H., Nishiyama Y., Kawaguchi Y.: Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J. Virol.* **79**, 9325–9331 (2005)
 47. Kato A., Yamamoto M., Ohno T., Tanaka M., Sata T., Nishiyama Y., Kawaguchi Y.: Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral US3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31. *J. Virol.* **80**, 1476–1486 (2006)
 48. Klupp B., Altenschmidt J., Granzow H., Fuchs W., Mettenleiter T.C.: Glycoproteins required for entry are not necessary for egress of pseudorabies virus. *J. Virol.* **82**, 6299–6309 (2008)
 49. Klupp B.G., Granzow H., Mettenleiter T.C.: Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J. Gen. Virol.* **82**, 2363–2371 (2001)
 50. Kope-Szlezak J.: Subpopulacje limfocytów T. *Onkol. Pol.* **8**, 17–20 (2005)
 51. Labiuk S.L., Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S.: Major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus 1 is phosphorylated by viral US3 and cellular CK2 protein kinases. *J. Gen. Virol.* **90**, 2829–2839 (2009)
 52. Labiuk S.L., Lobanov V., Lawman Z., Snider M., Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S.: Bovine herpesvirus-1 US3 protein kinase: critical residues and involvement in the phosphorylation of VP22. *J. Gen. Virol.* **91**, 1117–1126 (2010)
 53. Ladelfa M.F., Kotsias F., Zajac M.P., Van den Broeke C., Favoreel H., Romera S.A., Calamante G.: Effect of the US3 protein of bovine herpesvirus 5 on the actin cytoskeleton and apoptosis. *Vet. Microbiol.* **153**, 361–366 (2011)

54. Leach N., Bjerke S.L., Christensen D.K., Bouchard J.M., Mou F., Park R., Baines J., Haraguchi T., Roller R.J.: Emerin is hyperphosphorylated and redistributed in herpes simplex virus type 1-infected cells in a manner dependent on both UL34 and US3. *J. Virol.* **81**, 10792–10803 (2007)
55. Leader D.P., Deana A.D., Marchiori F., Purves F.C., Pinna L.A.: Further definition of the substrate specificity of the alpha-herpesvirus protein kinase and comparison with protein kinases A and C. *Biochim. Biophys. Acta*, **1091**, 426–431 (1991)
56. Leopardi R., Van Sant C., Roizman B.: The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7891–7896 (1997)
57. Lesiak D., Brzowska A., Rychłowski M., Bieńkowska-Szewczyk K., Lipiska A.D.: Evasion of antiviral host responses by a multifunctional serine/threonine kinase of Alphaherpesviruses. 37th International Herpesvirus Workshop Poster 9.48 (2012)
58. Liang L., Roizman B.: Expression of gamma interferon-dependent genes is blocked independently by virion host shutoff RNase and by US3 protein kinase. *J. Virol.* **82**, 4688–4696 (2008)
59. McGeoch D.J., Davison A.J.: Alphaherpesviruses possess a gene homologous to the protein kinase gene family of eukaryotes and retroviruses. *Nucleic Acids Res.* **14**, 1765–1777 (1986)
60. Morimoto T., Arii J., Tanaka M., Sata T., Akashi H., Yamada M., Nishiyama Y., Uema M., Kawaguchi Y.: Differences in the regulatory and functional effects of the US3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2. *J. Virol.* **83**, 11624–11634 (2009)
61. Morris J.B., Hofemeister H., O'Hare P.: Herpes Simplex virus infection induces phosphorylation and delocalization of emerin, a key inner nuclear membrane protein. *J. Virol.* **81**, 4429–4437 (2007)
62. Mou F., Forest T., Baines J.D.: US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J. Virol.* **81**, 6459–6470 (2007)
63. Mou F., Wills E., Baines J.D.: Phosphorylation of the UL31 protein of herpes simplex virus 1 by the US3 encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *J. Virol.* **83**, 5181–5191 (2009)
64. Murata T., Goshima F., Daikoku T., Takakuwa H., Nishiyama Y.: Expression of herpes simplex virus type 2 US3 affects the Cdc42/Rac pathway and attenuates c-Jun N-terminal kinase activation. *Genes Cells*, **5**, 1017–1027 (2000)
65. Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J., Herpesviridae (w) Veterinary Virology, wyd. 3, Academic Press, San Diego, 1999, s. 302, 309–322
66. Ogg P.D., McDonnell P.J., Ryckman B.J., Knudson C.M., Roller R.J.: The HSV-1 US3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members. *Virology*, **319**, 212–224 (2004)
67. Peri P., Mattila R.K., Kantola H., Broberg E., Karttunen H.S., Waris M., Vuorinen T., Hukkanen V.: Herpes simplex virus type 1 US3 gene deletion influences toll-like receptor responses in cultured monocytic cells. *Virology*, **5**, 140 (2008)
68. Piroozmand A., Koyama A.H., Shimada Y., Fujita M., Arakawa T., Adachi A.: Role of Us3 gene of herpes simplex virus type 1 for resistance to interferon. *Int. J. Mol. Med.* **14**, 641–645 (2004)
69. Poon A.P., Benetti L., Roizman B.: U(S)3 and U(S)3.5 protein kinases of herpes simplex virus 1 differ with respect to their functions in blocking apoptosis and in virion maturation and egress. *J. Virol.* **80**, 3752–3764 (2006)
70. Poon A.P., Gu H., Roizman B.: ICP0 and the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 independently block histone deacetylation to enable gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 9993–9998 (2006)
71. Poon A.P., Roizman B.: Herpes simplex virus 1 ICP22 regulates the accumulation of a shorter mRNA and of a truncated US3 protein kinase that exhibits altered functions. *J. Virol.* **79**, 8470–8479 (2005)
72. Purves F.C., Longnecker R.M., Leader D.P., Roizman B.: Herpes simplex virus 1 protein kinase is encoded by open reading frame US3 which is not essential for virus growth in cell culture. *J. Virol.* **61**, 2896–2901 (1987)
73. Purves F.C., Ogle W.O., Roizman B.: Processing of the herpes simplex virus regulatory protein alpha 22 mediated by the UL13 protein kinase determines the accumulation of a subset of alpha and gamma mRNAs and proteins in infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6701–6705 (1993)
74. Purves F.C., Spector D., Roizman B.: The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the US3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the UL34 gene. *J. Virol.* **65**, 5757–5764 (1991)
75. Rao P., Pham H.T., Kulkarni A., Yang Y., Liu X., Knipe D.M., Cresswell P., Yuan W.: Herpes simplex virus 1 glycoprotein B and US3 collaborate to inhibit CD1d antigen presentation and NKT cell function. *J. Virol.* **85**, 8093–8104 (2011)
76. Reynolds A.E., Ryckman B.J., Baines J.D., Zhou Y., Liang L., Roller R.J.: U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J. Virol.* **75**, 8803–8817 (2001)
77. Rodrigues R., Cuddington B., Mossman K.: Bovine herpesvirus type 1 as a novel oncolytic virus. *Cancer Gene Ther.* **17**, 344–355 (2010)
78. Roizman B., Knipe D.M., Whitley R., Herpes simplex viruses (w) Fields Virology, wyd. 5, red. Howley P., Philadelphia: Lippincott, 2007, s. 2501–2601
79. Roizman B., Pellet P.E., The family *Herpesviridae*: a brief introduction (w) Fields virology, wyd. 5, red. Howley P., Philadelphia: Lippincott, 2007, s. 2480–2499
80. Ryckman B.J., Roller R.J.: Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *J. Virol.* **78**, 399–412 (2004)
81. Schaap A., Fortin J.F., Sommer M., Zerboni L., Stamatis S., Ku C.C., Nolan G.P., Arvin A.M.: T-cell tropism and the role of ORF66 protein in pathogenesis of varicella-zoster virus infection. *J. Virol.* **79**, 12921–12933 (2005)
82. Schumacher D., McKinney C., Kauffer B.B., Osterrieder N.: Enzymatically inactive U(S)3 protein kinase of Marek's disease virus (MDV) is capable of depolymerizing F-actin but results in accumulation of virions in perinuclear invaginations and reduced virus growth. *Virology*, **375**, 37–47 (2008)
83. Schumacher D., Tischer B.K., Trapp S., Osterrieder N.: The protein encoded by the US3 orthologue of Marek's disease virus is required for efficient de-envelopment of perinuclear virions and involved in actin stress fiber breakdown. *J. Virol.* **79**, 3987–3997 (2005)
84. Schürmann A., Mooney A.F., Sanders L.C., Sells M.A., Wang H.G., Reed J.C., Bokoch G.M.: p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 453–461 (2000)
85. Skiba M., Glowinski F., Koczan D., Mettenleiter T.C., Karger A.: Gene expression profiling of Pseudorabies virus (PrV) infected bovine cells by combination of transcript analysis and quantitative proteomic techniques. *Vet. Microbiol.* **143**, 14–20 (2010)
86. Sloan D.D., Zahariadis G., Posavad C.M., Pate N.T., Kussick S.J., Jerome K.R.: CTL are inactivated by herpes simplex virus-infected cells expressing a viral protein kinase. *J. Immunol.* **171**, 6733–6741 (2003)

87. Struhl K.: Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* **12**, 599–606 (1998)
88. Takashima Y., Tamura H., Xuan X., Otsuka H.: Identification of the US3 gene product of BHV-1 as a protein kinase and characterization of BHV-1 mutants of the US3 gene. *Virus Res.* **59**, 23–34 (1999)
89. Trapani J.A.: Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Gen. Biol.* **2**, 3014.1–3014.7 (2001)
90. Wagenaar F., Pol J.M., Peeters B., Gielkens A.L., de Wind N., Kimman T.G.: The US3-encoded protein kinase from pseudorabies virus affects egress of virions from the nucleus. *J. Gen. Virol.* **76**, 1851–1859 (1995)
91. Walters M.S., Erazo A., Kinchington P.R., Silverstein S.: Histone deacetylases 1 and 2 are phosphorylated at novel sites during varicella-zoster virus infection. *J. Virol.* **83**, 11502–11513 (2009)
92. Walters M.S., Kinchington P.R., Banfield B.W., Silverstein S.: Hyperphosphorylation of histone deacetylase 2 by alphaherpesvirus US3 kinases. *J. Virol.* **84**, 9666–9676 (2010)
93. Wang X., Patenode C., Roizman B.: US3 protein kinase of HSV-1 cycles between the cytoplasm and nucleus and interacts with programmed cell death protein 4 (PDCD4) to block apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14632–14636 (2011)
94. Wisner T.W., Wright C.C., Kato A., Kawaguchi Y., Mou F., Baines J.D., Roller R.J., Johnson D.C.: Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J. Virol.* **83**, 3115–3126 (2009)
95. Van den Broeke C., Deruelle M., Nauwynck H.J., Collier 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. *Viol.* **385**, 155–160 (2009)
96. 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)
97. Van den Broeke C., Radu M., Nauwynck H.J., Chernoff J., Favoreel H.W.: Role of group A p21-activated kinases in the anti-apoptotic activity of the pseudorabies virus US3 protein kinase. *Virus Res.* **155**, 376–380 (2011)
98. Van Minnebruggen G., Favoreel H.W., Jacobs L., Nauwynck H.J.: Pseudorabies virus US3 protein kinase mediates actin stress fiber breakdown. *J. Virol.* **77**, 9074–9080 (2003)
99. York I.A., Johnson D.C.: Direct contact with herpes simplex virus-infected cells results in inhibition of lymphokine-activated killer cells because of cell-to-cell spread of virus. *J. Infect. Dis.* **168**, 1127–1132 (1993)
100. Young L.S., Dawson C.W., Eliopoulos A.G.: Viruses and apoptosis. *Br. Med. Bull.* **53**, 509–521 (1997)

Praca naukowa finansowana ze środków projektu badawczego POMOST/2010-2/7 Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.