

Received: 2012.03.26  
Accepted: 2012.09.28  
Published: 2012.10.29

## Rola białek motorycznych cytoszkieletu w zakażeniu wirusowym

### Role of cytoskeletal motor proteins in viral infection

Anna Słońska<sup>1</sup>, Rafał Polowy<sup>2</sup>, Anna Golke<sup>1</sup>, Joanna Cymerys<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Wirusologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie – SGGW

<sup>2</sup> Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie – SGGW

#### Streszczenie

Cytoskielet, zbudowany z filamentów aktynowych, mikrotubul i filamentów pośrednich, reguluje wiele procesów zachodzących w komórce, m.in. transport wewnątrzkomórkowy. Mikrofilamenty oraz mikrotubule są włóknami spolaryzowanymi, wzdłuż których możliwy jest dwukierunkowy ruch białek motorycznych: miozyny wzdłuż włókien aktyny oraz kompleksu dyneina/dynaktyna i kinezy wzdłuż mikrotubul. Wirusy podczas zakażenia wykorzystują struktury cytoszkieletu i jego białka motoryczne na różnych etapach cyklu replikacyjnego. Podczas wnikania do komórki i jej opuszczania, wirusy muszą pokonać korową warstwę mikrofilamentów, co odbywa się zazwyczaj z udziałem miozyny. W cytoplazmie wirusy są transportowane z udziałem dyneiny w stronę centrum organizacji mikrotubul, natomiast po namnożeniu się wirusa kinezy przemieszczają nowe wiriony na obrzeża komórki, umożliwiając tym samym uwolnienie wirionów potomnych. Niektóre rodziny wirusów rozwinęły alternatywne metody transportu wewnątrzkomórkowego.

W pracy opisano interakcje między wirusami a białkami motorycznymi cytoszkieletu oraz ustalono ich udział w zakażeniu wirusowym w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe.

**Słowa kluczowe:** wirusy • cytoskielet • białka motoryczne

#### Summary

Cytoskeleton, composed of actin filaments, microtubules and intermediate filaments, regulates many processes in the cell, e.g. intracellular transport. Actin and microtubules are polarized structures, along which bidirectional transport of motor proteins occurs: myosins along actin and the dynein/dynactin complex and kinesins along microtubules. Viruses interact with the cytoskeleton and motor proteins at different stages during their replication cycle. When entering and egressing the cell, viruses must penetrate the cortical layer of microfilaments, which usually takes place with the contribution of myosin. In the cytoplasm, retrograde transport involving dynein is used to move viruses to the microtubule organizing center. After replication, kinesins participate in anterograde transport of newly produced virions to the peripheral region, close to the plasma membrane. Some families of viruses have developed alternate routes of intracellular transport.

The aim of this study is to describe the interactions between virus and cytoskeletal motor proteins and to determine their role in viral infection according to the current literature data.

**Key words:** viruses • cytoskeleton • motor proteins



<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1016360">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1016360</a>
<b>Word count:</b>	3915
<b>Tables:</b>	–
<b>Figures:</b>	3
<b>References:</b>	29

**Adres autorki:** mgr Anna Słońska, Zakład Wirusologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie – SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: anex007@op.pl

**Wykaz skrótów:** **AcMNV** – autographa californica multicapsid nucleopolyherdovirus; **BDM** – monoksym 2,3-butanodionu (2,3-butanedione monoxime); **CAV-2** – psi adenowirus serotypu 2 (canine adenovirus serotype 2); **CPV** – psi parwowirus (canine parvovirus); **DIC** – łańcuch pośredni dyneiny (dynein intermediate chain); **DLIC** – łańcuch lekki pośredni dyneiny (dynein light intermediate chain); **HFV** – wirus pianisty człowieka (human foamy virus); **HHV-1** – ludzki herpeswirus typu 1 (human herpesvirus type 1); **HHV-8** – ludzki herpeswirus typu 8 (human herpesvirus type 8); **HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus); **KHC** – łańcuch ciężki kinezy (kinesin heavy chain); **KIF** – rodzina kinezyn (kinesin superfamily proteins); **KLC** – łańcuch lekki kinezy (kinesin light chain); **MLV** – wirus mysiej białaczki (murine leukemia virus); **MTOC** – centrum organizacji mikrotubul (microtubule organizing centre); **NMHC-IIA** – niemięśniowa miozyna IIA (non-muscle myosin IIA heavy chain IIA); **PIC** – kompleks przedintegracyjny (preintegration complex); **PRV** – wirus wścieklizny rzekomej (pseudorabies virus); **RTC** – kompleks odwrotnej transkrypcji (reverse transcription complex); **SIV** – małpi wirus niedoboru odporności (simian immunodeficiency virus); **SuHV-1** – świński herpeswirus typu 1 (suid herpesvirus type 1); **VACV** – wirus krowianki (vaccinia virus); **VAMP2** – białko błonowe 2 (vesicle-associated membrane protein 2).

## WPROWADZENIE

Cytoszkielec jest trójwymiarową siecią białkowych włókien i rurek, tworzących rusztowanie komórek eukariotycznych. Jego obecność jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania, ponieważ uczestniczy w podziałach i ruchu komórek, odpowiada za sprężystość cytoplazmy, bierze udział w transporcie wewnątrzkomórkowym, a także chroni komórkę przed urazami mechanicznymi. Zbudowany jest z trzech rodzajów białkowych włókien: aktyny, mikrotubul i filamentów pośrednich. Spolaryzowana struktura włókien aktynowych oraz mikrotubul i obecność białek motorycznych, umożliwia dwukierunkowy transport ładunków cytoplazmatycznych (transport odśrodkowy, czyli *anterogradowy* i dośrodkowy, czyli *retrogradowy*) [22].

Cytoszkielec odgrywa szczególną rolę podczas zakażenia wirusowego. Mimo wielu kierunków badań związanych z cytoszkieletem, zagadnienie to wzbudza coraz szersze zainteresowanie wielu badaczy [27]. Wirusy jako bezwzględne wewnątrzkomórkowe pasożyty, wykształciły wiele mechanizmów ułatwiających im replikację w komórce gospodarza. Jednym z możliwych mechanizmów uszkadzającego oddziaływania wirusów na komórkę jest jego wpływ na elementy cytoszkieletu. Wiadomo, że podczas zakażenia wirusowego może dochodzić do reorganizacji uporządkowanej sieci cytoszkieletu [4]. Wirusy wykorzystują wszystkie jego elementy, w tym białka motoryczne, podczas wewnątrzkomórkowego transportu wirionów, na różnych etapach replikacji. Cytoszkielec oraz białka motoryczne są wykorzystywane przez wirusy począwszy od wnikięcia do komórki i replikacji, aż po uwolnienie

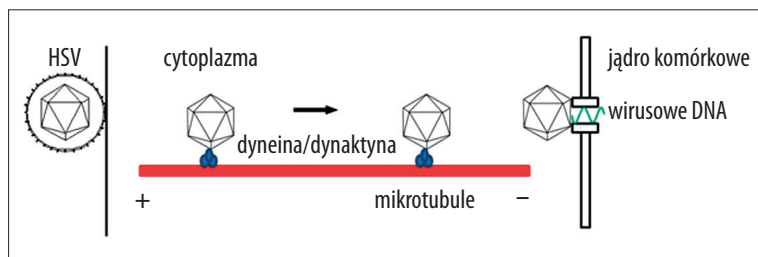
wirionów potomnych do środowiska. Włókna aktynowe oraz miozyny wykorzystywane są przez wirusy wówczas, gdy znajdują się na obrzeżach komórki lub w okolicy jądra komórkowego. Z kolei oddziaływanie z mikrotubulami i ich białkami motorycznymi: dyneiną i kinezyną, pozwala wirusom na transport między peryferyjnymi obszarami komórki a jej wnętrzem. Procesy te są podobne do naturalnych mechanizmów transportu wewnątrzkomórkowego [22]. Należy w tym miejscu podkreślić, że różne wirusy podczas zakażenia produktywnego mogą inaczej wpływać na poszczególne elementy cytoszkieletu, w odmienny sposób uszkadzając komórkę.

## BIAŁKA MOTORYCZNE CYTOSZKIELETU

Białka motoryczne, zwane inaczej białkami kroczącymi lub transportowymi, odgrywają istotną rolę w komórkach. Stanowią one grupę białek enzymatycznych, hydrolizujących ATP i wykorzystujących wyzwalaną w ten sposób energię do generowania sił niezbędnych podczas transportu wewnątrzkomórkowego. Różnią się między sobą trzema głównymi cechami:

- typem filamentu, z którym się wiążą (aktyna lub mikrotubule),
- kierunkiem ruchu wzdłuż filamentu oraz
- rodzajem transportowanego ładunku.

Polaryzacja mikrofilamentów i mikrotubul umożliwia lepszą organizację transportu wewnątrzkomórkowego, ponieważ określone białka motoryczne są w stanie efektywnie przemieszczać się tylko w stronę jednego końca włókna cytoszkieletu [9]. Transport w stronę ujemnego końca



Ryc. 1. Wewnątrzkomórkowy transport ludzkiego herpeswirusa typu 1 (HHV). Po fuzji otoczki wirusowej z błoną komórkową kapsyd jest uwalniany do cytoplazmy, a następnie za pomocą kompleksu dyneina/dynaktyna (kolor niebieski) transportowany jest wzdłuż mikrotubul (kolor czerwony) w stronę jądra komórkowego (wg [10] zmodyfikowano)

filamentów nazywamy retrogradowym, natomiast w stronę końca dodatniego anterogradowym. Białkami motorycznymi dla aktyny są miozyny, których kierunek poruszania się zależy od klasy białka. Za transport anterogradowy wzdłuż mikrotubul odpowiedzialne są białka z rodziny kinezyn, zaś ruch retrogradowy ładunków cytoplazmatycznych jest możliwy za pośrednictwem kompleksu białek dyneina/dynaktyna oraz niektórych kinezyn [13, 22].

### UDZIAŁ BIAŁEK MOTORYCZNYCH W ZAKAŻENIU WIRUSOWYM

Sama reorganizacja struktury cytoszkieletu nie jest wystarczająca, aby mogło dojść do skutecznego zakażenia. Obecność wewnątrz komórki licznych organelli, elementów cytoszkieletu, jonów i białek, właściwie uniemożliwia swobodną dyfuzję cząsteczek większych niż 500 kDa w cytoplazmie [22], a jest to mniej niż wynosi masa wielu wirusów. Dlatego też wirusy potrafią wykorzystywać naturalne drogi transportu wewnątrzkomórkowego za pośrednictwem białek motorycznych, które są szybkim i bardzo skutecznym środkiem transportu. Szczególnie ważne są one dla wirusów zakażających duże spolaryzowane komórki, takie jak np. neurony. Wirusy penetrują cytoplazmę wewnątrz pęcherzyków endosomalnych prawidłowo transportowanych przez białka motoryczne lub zaburzają homeostazę i przylączają je bezpośrednio do swojej powierzchni [7].

### Herpesviridae

Do wirusów powodujących uszkodzenia cytoszkieletu komórki gospodarza należą wirusy z rodziny *Herpesviridae*, a ich interakcje z białkami motorycznymi cytoszkieletu należą do jednych z najlepiej poznanych. Wykorzystują one wewnątrzkomórkowy transport na każdym etapie cyklu replikacyjnego. Jest to istotne zwłaszcza dla wirusów z podrodziny *Alphaherpesviridae* zakażających komórki nerwowe, gdyż aby dotrzeć do miejsca replikacji, muszą przebyć całą długość aksonu aż do ciała neuronu.

Przemieszczanie się wirionów wzdłuż filopodiów uzależnione jest od miozyny II, zaś traktowanie komórek inhibitorem miozyny – blebbistatyną, wyraźnie obniża skuteczność zakażenia [29]. Białko receptorowe ludzkiego herpeswirusa typu 1 (human herpesvirus type 1 – HHV-1) – gB, jest niezbędne podczas wnikania wirusa do komórki, działając receptorem – PILR $\alpha$  (paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha), ale również wiąże się z łańcuchem ciężkim niemięśniowej miozyny IIA (non-muscle myosin IIA heavy chain IIA, NMHC-IIA). Wkrótce po zakażeniu HHV-1 obserwuje się nagromadzenie NMHC-IIA w pobliżu błony komórkowej, gdzie może być ona eksponowana na powierzchni komórki, co ułatwia wirusowi penetrację. Delecje oraz zastosowanie przeciwciał anti-NMHC-IIA hamują wnikanie wirusa [29].

Inhibitor kinazy ML-7 lub chelacja jonów zmniejsza podatność komórek linii Vero na zakażenie HHV-1 [29]. Podczas replikacji w jądrze elementy HHV-1 są przemieszczane z udziałem nowo powstałych włókien aktyny i miozyny. Ten sam mechanizm zachodzi podczas replikacji świńskiego herpeswirusa typu 1 (suid herpesvirus type 1 – SuHV-1, PRV), stwierdzono bowiem kolokalizację białka kapsydu SuHV-1 – VP26 z miozyną V. Natomiast w komórkach linii Hep-2, aktywny transport HHV-1 był hamowany w wyniku depolimeryzacji aktyny oraz zastosowania inhibitora miozyny – monoksydu 2,3-butano-dionu (BDM) [18]. Miozyna jest wykorzystywana przez herpeswirusy do transportu wirionów wewnątrz komórki gospodarza, a także podczas ostatnich etapów zakażenia, kiedy wiriony potomne pokonują korową warstwę aktyny w czasie uwalniania [29].

Po wniknięciu do komórki herpeswirusy są transportowane retrogradowo w stronę centrum organizacji mikrotubul (microtubule organizing centre – MTOC). Transport ten jest zależny od kompleksu dyneina/dynaktyna, zwłaszcza w silnie spolaryzowanych komórkach tkanki nabłonkowej i neuronach (ryc. 1).

Zakłócenie funkcjonowania białka motorycznego poprzez nadekspresję dynamityny w komórkach, zmniejsza o połowę liczbę wirionów dostarczanych do jądra. Odwrotna sytuacja zdarza się w przypadku komórek niespolaryzowanych, w których replikacja wirusa zachodzi nawet po depolimeryzacji mikrotubul i przy dużym stężeniu dynamityny, co oznacza, że kompleks dyneina/dynaktyna nie jest niezbędny do transportu wirionów [10]. Jednym z elementów wiążących dyneinę do herpeswirusów jest małe białko kapsydu – VP36, które reaguje z podjednostkami Tctex1 i rp3 lekkiego łańcucha dyneiny. Pozostaje ono integralną częścią cząsteczki zakaźnej, aż do osiągnięcia jądra komórkowego [8]. W celu potwierdzenia roli VP36 w ruchu retrogradowym zbadano mutanty HHV-1 pozbawione tego białka. Typ dziki docierał do miejsc replikacji w przeciągu 2–4 godzin, natomiast wiriony pozbawione VP36 nie łączyły się z rp3 i były losowo rozsiane w cytoplazmie, najczęściej w pobliżu błony komórkowej. W warunkach *in vitro*, VP36 nie jest niezbędne podczas replikacji wirusa, a tłumaczy to zidentyfikowanie innych elementów wirusowych zdolnych przylączać dyneinę. Część składowa tegumentu – VP11/12, także wykazuje powinowactwo do Tctex1 i rp3 i prawdopodobnie bierze udział we wczesnym transporcie wirionów wzdłuż mikrotubul przed odzieleniem się tegumentu od kapsydu, bądź przy składaniu wirionów potomnych [6]. Spośród innych elementów tegumentu, również pUL36 (VP1/2) oraz pUL37 są zdolne do wiązania „retrogradowych” białek motorycznych i najprawdopodobniej łączą one silnie cząsteczkę wirusa z łańcuchem pośrednim dyneiny [18]. VP1/2 jest największym



białkiem kodowanym przez herpeswirusy, zawierającym ponad 3000 aminokwasów. Odgrywa ono ważną funkcję podczas uwalniania wirusowego DNA przez pory jądrowe oraz jest wymagane podczas nabywania przez wirusa otoczki przed opuszczeniem komórki. Ze względu na główną rolę w cyklu replikacyjnym, prawdopodobnie stanowi ono rusztowanie dla innych białek tegumentu oraz otoczki. VP1/2 jest przyłączany przez pUL37 i w postaci kompleksu biorą one udział w transporcie retrogradowym. Delecje w genach tych białek u HHV-1, jak również u SuHV-1, prowadzą do nagromadzenia się bezotoczkowych kapsydów w cytoplazmie [29]. W przypadku wirusa opryszczki oba białka są niezbędne dla ruchu wzdłuż mikrotubul, natomiast wirus wścieklizny rzekomej pozbawiony pUL37, może nadal się namnażać [29]. Połączone pUL36 i pUL37 są też jednymi z niewielu białek tegumentu, obecnych na powierzchni wirusa, aż do czasu, gdy wirus osiągnie jądro komórkowe, co świadczy o ich ważnej roli w transporcie wewnątrzkomórkowym [18]. Innym białkiem wiążącym retrogradowe białka motoryczne jest UL34, znajdujące się w otoczce wirusa, które również wykazuje powinowactwo do łańcucha pośredniego dyneiny (dynein intermediate chain – DIC), jednak jego dokładna rola w transporcie wirusa jest nieznana [11].

Podczas opuszczania komórki, herpeswirusy korzystają z anterogradowego transportu wzdłuż mikrotubul. Wspomniane wcześniej białko VP1/2 jest także w stanie przyłączać kinezyne 1 do wewnątrzkomórkowych ładunków pochodzących z aparatu Golgiego, zawierających wiriony HHV-1. Kinezyne może być przyłączana do ładunków cytoplazmatycznych, gdy UL36 nie jest związane z kapsydem albo wówczas, gdy VP1/2 są już elementem wirionu. Innymi białkami wiążącymi kinezyne są US11 u HHV-1 i UL56 u HHV-2. Pierwsze ma powinowactwo do kinezyne 5b i białka występującego w łańcuchu lekkim kinezyne (kinesin light chain – KLC) – PAT1 oraz do innych elementów w komórce niezwiązanych z cytoszkieletem, takich jak: kwasy nukleinowe, białka hamujące wzrost komórki czy kinaza białkowa R i jej aktywator [18,29]. Jednak, US11 nie jest istotnym elementem wirusa i nie wszyscy przedstawiciele alfa-herpeswirusów mają jego homologi. Białko UL56, związane z błoną, reaguje z KIF1A (kinesin family member 1A), a następnie umiejscawia się w aparacie Golgiego. Chociaż jest konserwatywne u neurotropowych herpeswirusów, nie jest konieczne podczas replikacji. W neuronach pozbawione otoczki kapsydy mogą przyłączać kinezyne i są transportowane anterogradowo wzdłuż aksonów wraz ze składowymi błony komórkowej. Fluorescencyjne znakowanie wirionów SuHV-1 i HHV-1 pozwoliło ustalić, że ich ruch wzdłuż mikrotubul jest związany z przemieszczaniem się białka błonowego 2 (vesicle-associated membrane protein 2 – VAMP2), które bierze udział w procesach komunikacyjnych w synapsie. Z kolei zastosowanie mikroskopii elektronowej wykazało, że transport glikoprotein i białek tegumentu HHV-1 odbywa się wewnątrz błonowych struktur powstałych w aparacie Golgiego, do których przyłączają się białka regulujące ruch anterogradowy – Rab3A, SNAP-25, GAP-43 i kinezyne 1 [29]. Testy immunoprecypitacji dla łańcucha ciężkiego kinezyne (kinesin heavy chain, KHC) przeprowadzone na linii komórkowej Hep-2 zakażonej HHV-1 wskazały, że główne białko kapsydu VP5 i białka tegumentu – VP16, VP22 oraz wcześniej wspomniane US11, mogą się

wiązać z KHC. Jednak, w transporcie najprawdopodobniej uczestniczy bezpośrednio tylko US11, ponieważ podczas opuszczania komórki elementy kapsydu są otoczone przez osłonki wirusa, natomiast VP16 i VP22 przyłączają KHC za pośrednictwem US11 [18].

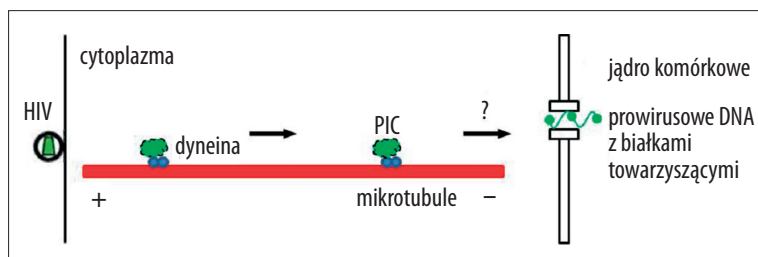
Z kolei ludzki herpeswirus typu 8 (human herpesvirus type 8 – HHV-8), należący do gamma-herpeswirusów, wykorzystuje swoje białko tegumentu – ORF45, aby przyłączać KIF3A (kinesin family member 3A), należące do kinezyne typu 2, podczas opuszczania komórki. Immunoprecypitacja i immunofluorescencja dowiodły, że białko to bezpośrednio bierze udział w przyłączaniu wirionu do domeny wiążącej ładunek w kinezyne. Mutacje w KIF3A oraz wyłączenie ekspresji genów tego białka motorycznego przez shRNA (small hairpin RNA), wyraźnie ograniczało uwalnianie HHV-8, natomiast nie wpłynęło na replikację HHV-1, co wskazuje, że ten mechanizm jest swoisty dla herpeswirusów limfotropowych [25].

Warto również podkreślić, że transport herpeswirusów wzdłuż mikrotubul jest dwukierunkowy, co oznacza, iż wirusy mogą przyłączać jednocześnie białka motoryczne przemieszczające się w przeciwnych kierunkach, podobnie jak w przypadku organelli komórkowych. Wirusy często zatrzymują się na włóknach cytoszkieletu, by po chwili znownie przesuwanie się, zmieniają filamety, po których są transportowane, a nawet kierunek przemieszczania się [7]. Dlatego, jeżeli w komórce występuje nadekspresja dynamityny, wnikające do środka kapsydy HHV-1, zamiast być losowo rozsiane w cytoplazmie, kumulują się przy błonie komórkowej, ponieważ są przemieszczane przez anterogradowe białka motoryczne. Po dotarciu do MTOC, wiriony muszą jeszcze pokonać krótki odcinek dzielący tę strukturę od jądra, tym samym przestawiając się na transport do końców „plus” mikrotubul. Mechanizm regulowania przez wirusy tego transportu nie został jeszcze dobrze poznany [10]. Zaproponowano trzy różne modele opisujące regulację transportu wirusowego. Pierwszy stanowi o wyłączości określonego białka motorycznego dla cząsteczki wirusa. Według niego z jednym wirionem może się wiązać na raz tylko jeden rodzaj białka motorycznego, które wymienia się z innymi i przez to zmieniany jest typ ruchu. Drugi to model „przeciągania liny”, gdzie intensywniej postępujący transport dominuje nad transportem w przeciwnym kierunku. Trzecią możliwością jest skoordynowana regulacja aktywności białek motorycznych przez określone mechanizmy podczas zakażenia [7].

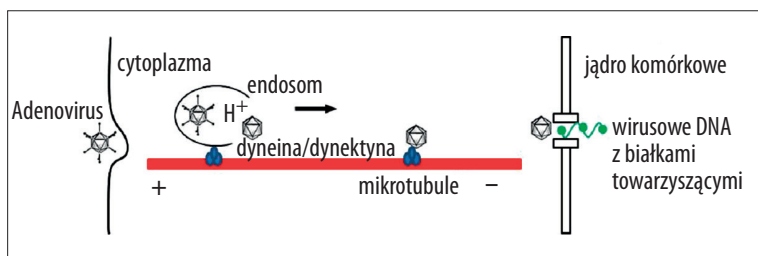
### *Retroviridae*

Kolejną rodziną wirusów wykorzystujących białka motoryczne są wirusy z rodziny *Retroviridae*. Informację genetyczną tych wirusów kodują dwie cząsteczki ssRNA (single-stranded RNA) zawierające zawsze trzy podstawowe geny: *gag*, *pol* i *env*.

Wirus mysiej białaczki (murine leukemia virus – MLV) oraz ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus – HIV) wykorzystują miozynie II podczas wnikania do komórki, która umożliwia im przemieszczanie się na powierzchni mikrokosmków i filopodiów do miejsc integracji. Proces ten jest uzależniony od połączenia się białka Env z receptorami na błonie [17]. Retrowirusy



Ryc. 2. Wewnątrzkomórkowy transport ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV). HIV wnika do komórki poprzez fuzję z błoną komórkową. Następnie wirusowe RNA ulega odwrotnej transkrypcji do DNA w kompleksie przedintegracyjnym (PIC, kolor zielony). Kompleks jest transportowany wzdłuż mikrotubul (kolor czerwony) z udziałem dyneiny (kolor niebieski). Prowirusowe DNA wnika do jądra komórkowego i zostaje zintegrowane z genomem gospodarza (wg [10] zmodyfikowano)



Ryc. 3. Wewnątrzkomórkowy transport adenowirusów. Adenowirus wnika do komórki gospodarza. Gdy pH wewnątrz pęcherzyka spada, wirusy opuszczają endosomy i dalej są transportowane z udziałem kompleksu dyneina/dynaktyna (kolor niebieski) wzdłuż mikrotubul (kolor czerwony) w stronę jądra komórkowego (wg [10] zmodyfikowano)

wymagają również filamentów aktynowych i miozyny, aby wydostać się do środowiska przez wypączkowanie [9]. Proces ten jest hamowany podczas depolimeryzacji aktyny i inhibicji kinazy lekkiego łańcucha miozyny, która reguluje działanie miozyny II [22]. Zastosowanie cytochalazyny D, powodującej depolimeryzację mikrofilamentów, hamuje uwalnianie wirionów, a transport nowo powstałych elementów HIV do miejsc składania znajdujących się w pobliżu błony komórkowej, odbywa się za pośrednictwem miozyny [14].

Transport wirusowego RNA jest zależny od endosomów i dyneiny. Aktywność białka Rab7, które reguluje procesy wewnątrzkomórkowego transportu, powoduje gromadzenie się pęcherzyków endosomalnych, dyneiny i wirusowego RNA w pobliżu jądra. Umieszczenie tych elementów ulega zmianie, jeżeli zastosuje się siRNA dla DHC lub doprowadzi do nadekspresji dynamityny. W tym przypadku materiał genetyczny wirusa i białko Gag wraz z endosomami lokalizuje się na obrzeżach komórki [16]. Białko Gag ma sekwencję wiążącą się z fragmentem LC8 lekkiego łańcucha dyneiny, co oznacza, że składowe rdzenia mogą być czynnikami przyciągającymi białka motoryczne. Wirus pienisty człowieka (human foamy virus – HFV), pozbawiony powinowactwa do DLC, jest dużo mniej zjadliwy [7]. Z drożdżowym homologiem dyneiny LC8 oddziałuje także integraza HIV. Kompleksy odwrotnej transkrypcji (reverse transcription complex – RTC) po wnikięciu wirusa najpierw są ustanawiane z udziałem filamentów aktynowych [2], a następnie przemieszczane wzdłuż mikrotubul do jądra. Zarówno HFV, jak i HIV, wykorzystują kompleks dyneina/dynaktyna podczas transportu kompleksu odwrotnej transkrypcji lub kompleksu przedintegracyjnego (preintegration complex – PIC) do przestrzeni okołojądrowej (ryc. 2) [20].

Odcinek między MTOC a jądrem, retrowirusy pokonują z udziałem kinezyń, zaś nadekspresja białka FEZ-1, regulującego transport mikrotubularny, zaburza aktywność kinezyny 1, co powstrzymuje wnikanie cDNA wirusa do

jądra [20]. Stwierdzono, że ważną rolę w ruchu anterogradowym cząsteczek HIV na obrzeża komórki pełnią KIF3A i KIF3C [16]. Innym elementem potrzebnym podczas transportu wirionów w stronę dodatnich końców mikrotubul jest KIF4, który jest przyłączany przez białko Gag MLV [20], HIV oraz małpiego wirusa niedoboru odporności (simian immunodeficiency virus – SIV). Sugeruje się, że kinezyzna ta może brać również udział w transporcie RTC, a także części rdzenia, po wnikięciu retrowirusów przed złożeniem wirionów potomnych [9].

### Adenoviridae

Białka motoryczne ogrywiają znaczącą rolę również w replikacji wirusów z rodziny *Adenoviridae*. Po połączeniu się białek fibrylarnych kapsydu z receptorem CAR (Coxsackievirus and Adenovirus receptor) i integrzynami, umieszczonymi na powierzchni błony komórkowej, adenowirusy wnikają do komórki w wyniku endocytozy. Kiedy pH wewnątrz pęcherzyka spada wirusy opuszczają endosomy i dalej są transportowane z udziałem mikrotubul (ryc. 3).

Psi adenowirus serotypu 2 (canine adenovirus serotype 2 – CAV-2), zakażający neurony, wykorzystuje podczas cyklu replikacyjnego zarówno dyneinę, jak i kinezynę. Nadekspresja dynamityny i domeny TPR łańcucha lekkiego kinezyny zakłóca transport cząsteczek wirusowych w komórce [12]. W przypadku ludzkich adenowirusów serotypu 2 i 5 (Ad2 i Ad5) stwierdzono, że wykorzystują one dyneinę wówczas, gdy transportowane są do MTOC. Depolimeryzacja mikrotubul oraz nadekspresja dynamityny zapobiegały zakażeniu CAV-2 [9]. W komórkach nabłonkowych, wirus ten szybko opuszcza endosomy i bezpośrednio łączy się z dyneiną, z kolei w neuronach ruchowych przebywa większość drogi w stronę jądra wzdłuż mikrotubul, wewnątrz pęcherzyków endocytarnych [12]. Za przyłączenie dyneiny do wirionu odpowiedzialny jest hekson, który jest głównym białkiem budującym kapsyd (240 trimerów na wirion). Aby skutecznie wiązać białka motoryczne,



hekson musi najpierw dojrzeć w niskim pH. Oczyszczone adenowirusy w pH obojętnym nie wykazywały interakcji z dyneiną, jednak po umieszczeniu w pH 4,4–5,4 ich zdolność wiązania znacząco wzrosła. Wyjaśnia to, dlaczego wirusy opuszczają dopiero późne endosomy o zakwaszonym wnętrzu. Hekson w niskim pH prawdopodobnie zmienia swoją konformację, co pozwala mu funkcjonować jako łącznik z białkami motorycznymi [26].

Interesujący jest sam mechanizm, w jaki adenowirusy wykorzystują białka motoryczne, który różni się od konwencjonalnych mechanizmów transportu wewnątrzkomórkowego. Hekson łączy kapsyd z dyneiną w sposób niezależny od czynników wspomagających przyłączanie ładunków, jakimi są dynaktyna, NudE/NudEL, LIS1 i ZW10 [1]. Powierzchnie przyczepu dla wirionu tworzy tandem DIC (dynein intermediate chain) i DLIC (dynein light intermediate chain) przy podstawie ciężkich łańcuchów dyneiny [26]. Kapsyd może się w ten sposób łączyć z kilkoma cząsteczkami dyneiny jednocześnie. Fragmenty łańcuchów pośrednich są również miejscem tworzenia kompleksu białka motorycznego z dynaktyną i NudE. Testy z wykorzystaniem przeciwciał stwierdzają, że hekson ma powinowactwo do swoistych dla siebie obszarów DIC. Zahamowanie aktywności dynaktyny nie wpływało na wydajność replikacji wirusa, zmniejszała jedynie prędkość, z jaką adenowirusy przemieszczały się do jądra. Sugeruje to, że wobec tego w przeciwnieństwie do prawidłowego transportu wewnątrzkomórkowego, białko to pełni wyłącznie funkcję regulacyjną podczas zakażenia [1]. Pozostałe czynniki: NudE/NudEL, LIS1 oraz ZW10 nie pełnią żadnej roli w przenoszeniu cząsteczek wirusowych. Dodatkowo, kompleks adenowirus-dyneina-dynaktyna jest niestandardowy, ponieważ dynaktyna jest związana z kapsydem za pośrednictwem dyneiny, czyli odwrotnie niż w przypadku innych wirusów [1]. Możliwość dwukierunkowego ruchu adenowirusów w cytoplazmie wskazuje, że wykorzystują one także kinezyne w ruchu anterogradowym, natomiast mechanizm tego procesu nie został jeszcze dobrze poznany [26].

### Parvoviridae

Wirusy z rodziny *Parvoviridae* wnikają do komórki poprzez endocytozę. Przykładem jest psi parwowirus (canine parvovirus – CPV), który transportowany jest w stronę jądra komórkowego w endosomach [28]. Transport wirionów, od wczesnych do późnych endosomów, zależy od sieci mikrotubul i cytoplazmatycznej dyneiny [9]. Cząstki wirusa po opuszczeniu pęcherzyków endocytarnych, są dalej transportowane w stronę jądra z udziałem mikrotubul. Testy immunoprecypitacji mające na celu odtworzenie zakażenia w warunkach *in vitro* potwierdziły oddziaływanie między kapsydami CPV, a dyneiną. Dodatkowo, traktowanie komórek nokodazolem, który powoduje depolimeryzację mikrotubul lub winblastyną, powodującą krystalizację włókien, spowodowało rozsianie wirionów w obszarze cytoplazmy, co w konsekwencji doprowadziło do tego, że nie docierały one do miejsca replikacji. Również obecność taksolu, który stabilizuje mikrotubule, nieznacznie obniżała transport kapsydów do jądra. Ponadto przy zniszczonych mikrotubulach, ekspresja markerowego wirusowego białka – NS1, które zapoczątkowuje replikację wirusowego DNA oraz transkrypcję promotorów wirusowych, była wyraźnie obniżona.

Ostatecznie rolę dyneiny w transporcie CPV do jądra komórkowego potwierdzają badania z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko białkom motorycznym. Cząsteczki wirusa najprawdopodobniej łączą się z pośrednimi łańcuchami dyneiny. Przeciwciała skierowane przeciwko dyneinie całkowicie zatrzymywały retrogradowy transport wirusa, natomiast immunoglobuliny przeciwko kinezyne nie wpływały na dystrybucję CPV. Zastosowanie mikroskopii elektronowej pozwoliło na stwierdzenie, że kapsydy, oprócz dyneiny mogą również aktywnie wiązać się z samymi mikrotubulami zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [9, 28].

### Poxviridae

Najwięcej informacji o interakcji między cytoszkieletem komórki gospodarza a wirusem dostarczają badania nad wirusem krowianki (vaccinia virus – VACV), należącym do rodziny *Poxviridae*. Replikacja wirusa zachodzi w cytoplazmie zakażonej komórki. Pierwszym produktem ekspresji genomu wirusa są białka i lipidy uformowane w błoniaste półksiężyce, przechodzące następnie w kuliste niedojrzałe wiriony (immature virions – IVs), zbudowane z genomu wirusa i białek rdzenia. IVs przechodzą w dojrzałe wewnątrzkomórkowe wirusy (intracellular mature virus – IMV) po proteolitycznym przetworzeniu niektórych białek kapsydu, które nie opuszczają gospodarza i dostają się do środowiska tylko po zniszczeniu komórki. IMV mogą uzyskiwać podwójną lipidową otoczkę ze wczesnych endosomów lub z aparatu Golgiego, po czym stają się wewnątrzkomórkowymi wirusami pokrytymi otoczką (intracellular enveloped virus – IEV). Dalej transportowane są wzdłuż mikrotubul na obrzeża komórki, gdzie indukują polimeryzację aktynowych ogonów (actin tails) [19]. W wyniku kontaktu z błoną komórkową, VACV przechodzi ostatnie modyfikacje. Fuzja z powierzchnią komórki prowadzi do powstania związanego z komórką wirusa pokrytego otoczką (cell-associated enveloped virus – CEV). Jeżeli CEV opuści komórkę, co najczęściej zachodzi dzięki wypchnięciu cząsteczki przez nowo powstałe mikrokosmki, to nazywany jest wówczas pozakomórkowym wirusem pokrytym otoczką (extracellular enveloped virus – EEV) [23]. CEV jest istotny dla zakażenia sąsiednich komórek, natomiast EEV służy do rozprzestrzeniania się patogenu w środowisku na większe odległości [19].

Po replikacji, IMC są transportowane retrogradowo wzdłuż mikrotubul w stronę MTOC, aby mogły nabyć otoczkę. W procesie tym bierze udział wirusowe białko A27L i dyneina. Nadekspresja dynamitryny spowodowała zahamowanie tego transportu [9]. Wirus krowianki, zanim zacznie indukować polimeryzację aktynowych ogonów w pobliżu błony komórkowej, wykorzystuje do transportu anterogradowego kinezyne 1, która jest przyłączana do białek F12 i A36R [19]. A36R jest białkiem błonowym, które nie tylko bierze udział w rekrutacji kinezyne do IEV, ale po przemieszczeniu się wirionu w pobliże powierzchni komórki, oddysocjowuje od niego i z udziałem innych białek – IEV A33R, A34R i B5R, zapoczątkowuje syntezę włókien aktynowych za cząsteczką CEV [23]. Z kolei F12 jest głównym białkiem przyłączającym kinezyne i wykazującym wiele cech wspólnych z łańcuchami lekkimi kinezyne. Oba białka mają zbliżone rozmiary, punkt izoelektryczny, hydrofobowość i bardzo podobne do siebie rejony TPR. F12 zawiera powtórzenia WD, będące podstawowym elementem

łączącym wirusa z białkiem motorycznym. Ten sam motyw ma również A36, ale w tym przypadku nie odpowiada za zespolenie białek. TPR, występujące w obu białkach, reagują z odpowiadającymi elementami na KLC i powodują aktywację domeny motorycznej KHC tak, jak się to dzieje przy przyłączaniu prawidłowych ładunków wewnątrzkomórkowych. Badania na mutantach VACV wykazały, że F12 i A36R łączą się z wirionem niezależnie od siebie, lecz tylko w obecności pierwszego z nich kinezyna może być używana do transportu wirusa. Przy braku A36R, wirusy mogą skutecznie poruszać się anterogradowo z prędkościami odpowiadającymi kinezynom [19]. Przemieszczanie się wirusa krowianki do końców „plus” MT nie jest procesem ciągłym – występują w nim częste przerwy, a przemierzane odległości są zmienne, w przeciwieństwie do systematycznego ruchu podczas polimeryzacji aktyny [24]. W pobliżu błony komórkowej, wirusowe białko B5R aktywuje kinezyny Src, które fosforylują tyrozynowe fragmenty A36R. Jest to sygnał do odłączenia kinezyny 1 od wirionu i rozpoczęcia powstawania ogonków aktynowych [22]. Przy tworzeniu włókien biorą udział białka gospodarza: Nck, Grb2, białko reagujące z WASP (WASP-interacting protein) oraz N-WASP. N-WASP uruchamia działanie kompleksu Arp2/3 powodującego polimeryzację aktyny za CEV [9]. Mikrofilamenty tworzone przez VACV są ułożone w gęstą sieć. Podobne zjawisko można zaobserwować u bakterii z rodzajów *Listeria*, *Rickettsia* oraz *Shigella*, jednakże wirusowe ogony aktynowe i mikrokosmki różnią się ułożeniem włókien. Pośród filamentów cienkich stwierdza się obecność wielu wiążących się z aktyną, takich jak:  $\alpha$ -aktynina, filamina oraz fimbryna, lecz brak wśród nich miozyny i tropomiozyny [3].

### Baculoviridae

Wirusy z rodziny *Baculoviridae* również wykorzystują cytoszkielet podczas replikacji w komórce gospodarza. Cechą wyróżniającą bakulowirusy jest brak udziału mikrotubul oraz ich białek motorycznych w transporcie wewnątrzkomórkowym wirionów. Po wnikięciu do komórki, AcMNV (autographa californica multicapsid nucleopolyherdovirus) indukuje powstawanie długich cienkich włókien aktynowych, z którymi się wiąże, a następnie jest wzdłuż nich transportowany w stronę jądra komórkowego [21]. Badania z wykorzystaniem inhibitora aktyny – cytochalazyny D wskazują, że wiriony znajdują się na ujemnych końcach filamentów. Wśród białek wirusowych za przyłączenie do aktyny odpowiedzialne są białka p39 i p78/83 [15]. To ostatnie stymuluje kompleks Arp2/3. AcMNPV wykorzystuje aktynę do transportu nukleokapsydów na obrzeża komórki, gdzie się gromadzą na zakończeniach aktynowych wypustek na powierzchni błony komórkowej [21]. Białkiem motorycznym wykorzystywanym przez bakulowirusy jest miozyna lub białko podobne do miozyny, co potwierdziły testy przeprowadzone na zakażonych komórkach émy – linii Sf9. Zastosowanie inhibitora mikrotubul

– nokodazolu nie wpłynęło na cykl replikacyjny wirusa, natomiast inhibitor miozyny – monoksym 2,3-butanodionu redukował zakaźność wirusem do 28% w porównaniu z próbą kontrolną [5]. Możliwym elementem wirionu, który bierze udział w rekrutacji białek motorycznych jest białko Ac66, ponieważ jest spokrewnione m.in. z białkiem wiążącym aktynę *Dictyostelium discoideum* oraz łańcuchem ciężkim króliczej miozyny, a jego homologi są obecne u wszystkich przedstawicieli rodziny. Mutanty z delecjami Ac66 wytwarzały prawidłowe wiriony potomne, lecz nie były w stanie zakażać sąsiednich komórek, ponieważ nie opuszczały pierwotnego gospodarza [24]. Wszystkie te fakty wskazują, że cytoszkielet aktynowy wraz z towarzyszącymi mu białkami motorycznymi, odgrywa ważną rolę w replikacji bakulowirusów.

### PODSUMOWANIE

Gruntowna wiedza na temat transportu wewnątrzkomórkowego, w którym biorą udział białka motoryczne, tj. miozyna, dyneina czy kinezyna, znacznie poszerza znajomość mechanizmów patogenezy zakażeń wirusowych [22,27]. Wirusy, jako bezwzględne pasożyty, w celu przeprowadzenia cyklu replikacyjnego, wykorzystują struktury obecne w komórce gospodarza, w tym cytoszkielet. Dane literaturowe poświęcone interakcjom między wirusem a cytoszkieletem, opisują wiele zmian jakim ulegają zarówno mikrotubule, jak i filamenty aktynowe. Pod wpływem zakażenia układ poszczególnych włókien cytoszkieletu może ulec rearanżacji, uszkodzeniu, a nawet całkowitemu zniszczeniu. Wiadomo, że największe znaczenie dla wirusów mają spolaryzowane włókna cytoszkieletu: aktyna oraz mikrotubule, ale również wykazujące do nich powinowactwo białka motoryczne, które są zdolne do przesuwania się wzdłuż spolaryzowanych włókien, uczestnicząc tym samym w transporcie wewnątrzkomórkowym. Aktyna wraz z miozyną są wykorzystywane do przemieszczania wirusów na obrzeżach komórki i w obrębie jądra. Natomiast mikrotubule wraz z kompleksem dyneina/dynaktyna oraz kinezynami regulują ruch wirionów między peryferiami cytoplazmy a centrami organizacji mikrotubul.

Należy w tym miejscu zaznaczyć, że wiedza ta ma nie tylko charakter teoretyczno-poznawczy. Poznanie mechanizmów transportu wewnątrzkomórkowego oraz zasad, na których się on opiera, może zostać wykorzystane w terapii przeciwwirusowej. W dobie narastającej oporności patogenów na leki stosowane podczas terapii farmakologicznych, daje to możliwość tworzenia nowych preparatów, których działanie nie polegałoby na hamowaniu enzymów wirusowych, lecz na hamowaniu swoistych interakcji pomiędzy wirusem a komórką gospodarza. Możliwe mogłoby się stać zatrzymanie replikacji wirusów przez zniszczenie lub zahamowanie aktywności białka, uczestniczącego w transporcie wirusa do miejsca replikacji lub też uniemożliwienie mu zakażenia sąsiednich komórek.

### PIŚMIENNICTWO

[1] Bremner K.H., Scherer J., Yi J., Verzhinin M., Gross S.P., Vallee R.B.: Adenovirus transport through a direct cytoplasmic dynein-hexon interaction. *Cell. Host. Microbe*, 2009; 6: 523–535

[2] Bukrinskaya A., Brichacek B., Mann A., Stevenson M.: Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J. Exp. Med.*, 1998; 188: 2113–2125



- [3] Cudmore S., Reckmann I., Griffiths G., Way M.: Vaccinia virus: a model system for actin-membrane interactions. *J. Cell. Sci.*, 1996; 109: 1739–1747
- [4] Cudmore S., Reckmann I., Way M.: Viral manipulations of the actin cytoskeleton. *Trends Microbiol.*, 1997; 5: 142–148
- [5] Dong S., Wang M., Qiu Z., Deng F., Vlak J.M., Hu Z., Wang H.: Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus efficiently infects Sf9 cells and transduces mammalian cells via direct fusion with the plasma membrane at low pH. *J. Virol.*, 2010; 84: 5351–5359
- [6] 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 Tctex 1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 28522–28530
- [7] Döhner K., Nagel C.H., Sodeik B.: Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol.*, 2005; 13: 320–327
- [8] 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 VP2. *J. Virol.*, 2006; 80: 8211–8224
- [9] Döhner K., Sodeik B.: The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2005; 285: 67–108
- [10] Döhner K., Wolfstein A., Prank U., Echeverri C., Dujardin D., Vallee R., Sodeik B.: Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol. Biol. Cell*, 2002; 13: 2795–2809
- [11] Garner J.A.: Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003; 55: 1497–1513
- [12] Henaff D., Salinas S.: An endocytic CARriage tale: Adenoviruses internalization and trafficking in neurons. *Virulence*, 2010; 1: 188–191
- [13] Hirokawa N.: Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, 1998; 279: 519–526
- [14] Jolly C., Mitar I., Sattentau Q.J.: requirement for an intact t-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, 2007; 81: 5547–5560
- [15] Lanier L.M., Volkman L.E.: Actin binding and nucleation by Autographa californica M nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 1998; 243: 167–177
- [16] Lehmann M., Milev M.P., Abrahamyan L., Yao X.J., Pante N., Moulard A.J.: Intracellular transport of human immunodeficiency virus type 1 genomic rna and viral production are dependent on dynein motor function and late endosome positioning. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 14572–14585
- [17] Lehmann M.J., Sherer N.M., Marks C.B., Pypaert M., Mothes W.: Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J. Cell Biol.*, 2005; 170: 317–325
- [18] Lyman M.G., Enquist L.W.: Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton. *J. Virol.*, 2009; 83: 2058–2066
- [19] Morgan G.W., Hollinshead M., Ferguson B.J., Murphy B.J., Carpentier D.C., Smith G.L.: Vaccinia protein F12 has structural similarity to kinesin light chain and contains a motor binding motif required for virion export. *PLoS Pathog.*, 2010; 6: e1000785
- [20] Naghavi M.H., Goff S.P.: Retroviral proteins that interact with the host cell cytoskeleton. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007; 19: 402–407
- [21] Ohkawa T., Volkman L.E., Welch M.D.: Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J. Cell Biol.*, 2010; 190: 187–195
- [22] Radtke K., Döhner K., Sodeik B.: Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell. Microbiol.*, 2006; 8: 387–400
- [23] Rietdorf J., Ploubidou A., Reckmann I., Holmström A., Frischknecht F., Zettl M., Zimmermann T., Way M.: Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat. Cell Biol.*, 2001; 3: 992–1000
- [24] Rohrmann G.F.: Introduction to the baculoviruses, their taxonomy, and evolution. In: *Baculovirus molecular biology – 2<sup>nd</sup> edition*. eds.: Bethesda (MD). National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information., 2011; 7–19
- [25] Sathish N., Zhu F.X., Yuan Y.: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF45 interacts with kinesin-2 transporting viral capsid-tegument complexes along microtubules. *PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000332
- [26] Scherer J., Vallee R.B.: Adenovirus recruits dynein by an evolutionary novel mechanism involving direct binding to pH-primed hexon. *Viruses*, 2011; 3: 1417–1431
- [27] Słońska A., Golke A., Solarska M., Cymerys J., Dzieciatkowski T., Bańbura M.: Wpływ zakażeń wirusowych na cytoszkielet komórki. *Post. Mikrob.*, 2011; 50: 121–130
- [28] Suikkanen S., Aaltonen T., Nevalainen M., Väililehto O., Lindholm L., Vuento M., Vihinen-Ranta M.: Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J. Virol.*, 2003; 77: 10270–10279
- [29] Zaichick S.V., Bohannon K.P., Smith G.A.: Alphaherpesviruses and the cytoskeleton in neuronal infections. *Viruses*, 2011; 3: 941–981

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów