



## Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

---

### ROZPRAWA DOKTORSKA

---

*Mgr Natalia Derewońko*

## Rola białek wirusowych oraz ich oddziaływanie z czynnikami komórkowymi podczas bezpośredniego transportu międzykomórkowego (*cell-to-cell spread*) alfaherpeswirusów

Role of viral proteins and their interaction with host factors during  
cell-to-cell spread of alphaherpesviruses

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk  
Promotor pomocniczy: dr Michał Rychłowski

Zakład Biologii Molekularnej Wirusów  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

GDAŃSK 2023

*Chciałabym serdecznie podziękować **prof. dr hab. Krystynie Bieńkowskiej-Szewczyk** za powierzenie mi najbardziej magicznego tematu w wirusologii (*cell-to-cell spread*), przekazaną wiedzę, cenne rady i okazaną życzliwość.*

*Dziękuję **dr Michałowi Rychłowskiemu** za wprowadzenie mnie do świata mikroskopii, zainteresowanie problematyką mojej pracy badawczej, nieustanne wsparcie i wspólne „burze mózgów”, które owocowały formowaniem kolejnych hipotez prowadzących do lepszego zrozumienia infekcji wirusowej.*

*Podziękowania kieruję również do **dr Falko Hochgräfe** oraz całego zespołu *Pathoproteomics Reserch Group*, Uniwersytet Ernst Moritz Arndt w Niemczech za współpracę podczas stażu, pomoc w eksperymentach oraz przemiłą i pełną humoru atmosferę w pracy.*

***Koleżankom i Kolegom z Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów i Zakładu Szczepionek Rekombinowanych** dziękuję za trafne sugestie, weryfikację hipotez, uwagi oraz pomoc.*

*Dziękuję również mojej **Rodzinie oraz moim wspaniałym Przyjaciółom** za próbę zrozumienia tematyki moich badań, cierpliwość, motywację do dalszej pracy oraz przekonanie mnie (przy pomocy różnych metod perswazji), że pora na chwilę odłożyć pipetę i napisać pracę.*

# Spis treści

Spis treści .....	1
<b>1. Wykaz skrótów .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Streszczenie .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Abstract .....</b>	<b>10</b>
<b>4. Wstęp .....</b>	<b>12</b>
4.1 <i>Alfaherpeswirusy - systematyka i przebieg infekcji .....</i>	12
4.1.1 Systematyka herpeswirusów i jednostki chorobowe .....	13
4.1.2 Budowa wirionów i organizacja genomu .....	16
4.1.3 Cykl replikacyjny .....	19
4.2 <i>Rozprzestrzenianie się wirusów na drodze bezpośredniego transportu międzykomórkowego (cell-to-cell spread) .....</i>	28
4.2.1 Mechanizmy bezpośredniego transportu międzykomórkowego .....	29
4.2.2 <i>Cell-to-cell spread</i> alfaherpeswirusów .....	33
4.3 <i>Bydlęcy herpeswirus typu 1 .....</i>	42
4.3.1 Choroby i profilaktyka .....	42
4.3.2 BHV-1 jako model do badań .....	44
4.3.3 Porównanie budowy i cyklu replikacyjnego BHV-1 do innych alfaherpeswirusów .....	45
4.3.4 Bezpośredni transport międzykomórkowy wirusa BHV-1 .....	46
4.4 <i>Techniki badania cell-to-cell spread .....</i>	52
4.4.1 Immunofluorescencja kontra analiza przyżyciowa .....	52
4.4.2 Badania interakcji białek wirusowych i komórkowych w CTC w czasie rzeczywistym – proteomika + mikroskopia .....	55
<b>5. Cele pracy doktorskiej .....</b>	<b>60</b>
<b>6. Materiały .....</b>	<b>61</b>
6.1 <i>Linie komórkowe oraz komórki pierwotne .....</i>	61
6.1.2 KOP-R (z niem. <i>Kalb Oesopharynx</i> ) .....	61
6.1.3 Pierwotne fibroblasty bydlęce .....	61
6.1.4 F2H®-BHK (Chromotek) .....	61
6.2 <i>Podłoża do hodowli komórek ssaczy .....</i>	61
6.2 <i>Wirus typu dzikiego i rekombinanty wirusa BHV-1 .....</i>	62
6.3.1 BHV-1 Lam .....	62
6.3.3 BHV-1 gE-TM .....	63
6.3.4 BHV-1 gE-TM-GFP .....	63
6.3.5 BHV-1ΔUS3 .....	63
6.3.6 BHV-1 US3 KD .....	63
6.3.7 BHV-1 gE-GFPΔUS3 .....	64
6.3.8 BHV-1 VP26-GFP (Jura) .....	64
6.3.9 BHV-1 WT Jura .....	64
6.4 <i>Przeciwciała .....</i>	64
6.5 <i>Szczepy bakteryjne .....</i>	65
6.5.1 <i>Escherichia coli</i> TOP TEN, Life Technologies, Invitrogen .....	65
6.5.2 NEB® 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency), New England Biolabs .....	65

6.6	<i>Plazmidy</i> .....	65
6.6.1	pJET1.2/blunt Amp <sup>R</sup> , Thermo Scientific .....	65
6.6.2	p-LEXY_I-blecherry 3, Jena Bioscience .....	65
6.6.3	pEGFP(C1)-PP1alpha Kan <sup>R</sup> .....	65
6.6.4	pFASTBacDual gE-GFP Amp <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> .....	65
6.6.5	pEGFP-C1 Kan <sup>R</sup> .....	66
6.7	<i>Startery do reakcji PCR</i> .....	66
6.8	<i>Podłoża do hodowli komórek bakteryjnych</i> .....	66
6.9	<i>Antybiotyki</i> .....	66
6.10	<i>Enzymy</i> .....	67
6.11	<i>Wzorce masowe</i> .....	67
6.12	<i>Bufory i roztwory</i> .....	68
6.13	<i>Odczynniki chemiczne</i> .....	70
6.14	<i>Zestawy komercyjne</i> .....	71
6.15	<i>Aparatura specjalistyczna</i> .....	72
6.16	<i>Dodatkowe materiały</i> .....	72
<b>7.</b>	<b>Metody</b> .....	<b>74</b>
7.1	<i>Hodowle komórek ssaczyh</i> .....	74
7.2	<i>Infekcja komórek ssaczyh wirusem BHV-1</i> .....	74
7.3	<i>Miareczkowanie wirusa</i> .....	75
7.4	<i>Test neutralizacji wirusa zewnątrzkomórkowego</i> .....	75
7.5	<i>Test immunodetekcji białek in situ (IPMA)</i> .....	77
7.6	<i>Pomiar wielkości tysinek</i> .....	77
7.7	<i>Mikroskopowa analiza przyżyciowa rekombinantów BHV-1</i> .....	77
7.8	<i>Cytometria przepływowa</i> .....	78
7.9	<i>Immunofluorescencja</i> .....	79
7.10	<i>Izolacja DNA wirusowego</i> .....	80
7.11	<i>Łączuchowa reakcja polimerazy (PCR)</i> .....	80
7.12	<i>Sekwencjonowanie DNA</i> .....	80
7.13	<i>Elektroforeza agarozowa</i> .....	81
7.14	<i>Izolacja DNA z żelu agarozowego</i> .....	81
7.15	<i>Ligacja DNA</i> .....	81
7.16	<i>Przygotowanie komórek kompetentnych</i> .....	81
7.17	<i>Transformacja komórek bakteryjnych DNA plazmidowym</i> .....	82
7.18	<i>Izolacja DNA plazmidowego z bakterii</i> .....	82
7.19	<i>Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi</i> .....	82
7.20	<i>Kotransfekcja DNA wirusowego i kasy do kotransfekcji</i> .....	83
7.21	<i>Izolacja fluorescencyjnych rekombinantów BHV-1 z fuzją VP26-mCherry</i> .....	84
7.22	<i>Krzywa wzrostu wirusa (z ang. one-step growth)</i> .....	84

7.23	<i>Liza komórek ssaczych zainfekowanych rekombinantami BHV-1</i> .....	85
7.24	<i>Koimmunoprecypitacja</i> .....	85
7.25	<i>Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)</i> .....	86
7.26	<i>Barwienie żeli poliakrylamidowych</i> .....	86
7.27	<i>Elektrotransfer półsuchy białek z żelu poliakrylamidowego na błonę PVDF</i> .....	87
7.28	<i>Western Blotting</i> .....	87
7.29	<i>Znakowanie izotopowe aminokwasów w pożywce hodowlanej (SILAC)</i> .....	87
7.30	<i>Przygotowanie próbek do spektrometrii masowej</i> .....	88
7.31	<i>Spektrometria masowa</i> .....	89
7.32	<i>Analiza przebiegu interakcji białkowych w czasie (z ang. time-course)</i> .....	89
7.33	<i>Klonowanie metodą NEBuilder®</i> .....	90
7.34	<i>Transfekcja/kotransfekcja DNA plazmidowym</i> .....	91
7.35	<i>Analiza oddziaływania białek w systemie hybrydowym F2H</i> .....	91
7.36	<i>Analiza statystyczna</i> .....	91
<b>8.</b>	<b>Wyniki</b> .....	<b>92</b>
8.1	<i>Analiza przyżyciowa rozprzestrzeniania się fluorescencyjnych rekombinantów BHV-1 na drodze CTC w hodowlach komórkowych</i> .....	92
8.1.1	<i>Określenie prędkości rozprzestrzeniania się fluorescencyjnych rekombinantów wirusowych BHV-1 na drodze CTC w żywych komórkach różnego typu</i> .....	92
8.1.2	<i>Konstrukcja fluorescencyjnych rekombinantów wirusa BHV-1 z białkiem VP26-mCherry</i> .	110
8.1.3	<i>Analiza przyżyciowa rozprzestrzeniania się rekombinanta BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry w międzykomórkowych nanorurkach (TNT)</i> .....	116
8.2	<i>Badanie oddziaływania kompleksu gE/gI z białkami komórkowymi w procesie transmisji wirusa BHV-1 na drodze CTC</i> .....	118
8.2.1	<i>Optymalizacja warunków infekcji oraz lizy komórek w celu przygotowania próbek do analizy w spektrometrze masowym</i> .....	118
8.2.2	<i>Identyfikacja potencjalnych partnerów komórkowych kompleksu gE/gI w spektrometrze masowym</i> .....	120
8.2.3	<i>Analiza interakcji kompleksu gE/gI z podjednostką katalityczną białkowej fosfatazy 1 <math>\alpha</math> (PP1<math>\alpha</math>)</i> . 124	
	<i>Podsumowanie wyników:</i> .....	134
<b>9.</b>	<b>Dyskusja</b> .....	<b>135</b>
<b>10.</b>	<b>Wnioski</b> .....	<b>157</b>
<b>11.</b>	<b>Bibliografia</b> .....	<b>159</b>
	<b>Dodatkowe materiały</b> .....	<b>188</b>

# 1. Wykaz skrótów

**A549** - linia komórek nabłonkowych gruczołka płuca  
**aa** - aminokwasy (z ang. *amino acids*)  
**AC** - region aminokwasów kwaśnych (z ang. *acidic cluster*)  
**ADP** - adenylozodifosforan  
**ANT2** - translokaza ADP/ATP 2 (z ang. *ADP/ATP translocase 2*)  
**ASFV** - wirus afrykańskiego pomoru świń (z ang. *African swine fever virus*)  
**AP** - alkaliczna fosfataza (z ang. *alkaline phosphatase*)  
**aPKC** - atypowa komórkowa kinaza C (z ang. *atypical protein kinase C*)  
**ATP** - adenylozotryfosforan  
**ATPaza** - adenylozotryfosfataza  
**BAC** - sztuczny chromosom bakteryjny (z ang. *bacterial artificial chromosome*)  
**BHK** - linia komórek nerki chomika (z ang. *baby hamster kidney*)  
**BHV-1** - bydłęcy herpeswirus typu 1 (z ang. *Bovine Herpesvirus type 1*)  
**BHV-5** - bydłęcy herpeswirus typu 5 (z ang. *Bovine Herpesvirus type 5*)  
**bICP** - z ang. *BHV-1 infected cell protein*  
**BP-B** - błona komórkowa podstawno-boczna  
**BRCA-1** - z ang. *breast cancer type 1 susceptibility protein*  
**BRDC** - zespół oddechowy bydła (z ang. *Bovine Respiratory Disease Complex*)  
**BW** - błona komórkowa wierzchołkowa  
**Cas9** - związana z CRISPR endonukleaza 9 (z ang. *CRISPR associated protein 9*)  
**Cdc42** - z ang. *cell division control protein 42*  
**CFE** - transmisja wirusów ze środowiska zewnątrzkomórkowego (z ang. *cell-free entry*)  
**CFP** - białko cyjanowej fluorescencji (z ang. *cyan fluorescent protein*)  
**CHAPS** - 3-((3-cholamidopropyl)dimetyloammonio)-1-propanosulfonian  
**CRISPR** - zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne (z ang. *Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats*)  
**CT** - domena cytoplazmatyczna (z ang. *cytoplasmic domain*)  
**CTC** - bezpośrednia transmisja międzykomórkowa (z ang. *cell-to-cell spread*)  
**DMSO** - dimetylosulfotlenek (z ang. *dimethyl sulfoxide*)  
**DNA** - kwas deoksyrybonukleinowy (z ang. *deoxyribonucleic acid*)  
**dNTPs** - deoksynukleotydy (z ang. *deoxynucleotide triphosphate*)  
**dsDNA** - dwuniciowy kwas deoksyrybonukleinowy (z ang. *double-stranded DNA*)  
**dUTPaza** - deoksyurydynopirofosfataza  
**E** - geny wczesne (z ang. *early genes*)  
**EBV** - wirus Epsteina-Barra (z ang. *Epstein-Barr virus*)  
**ECL** - chemiluminescencja (z ang. *enhanced chemiluminescence*)  
**EDTA** - kwas etylenodiaminotetraoctowy  
**EE** - wczesne endosomy (z ang. *early endosomes*)  
**EHV-1** - koński herpeswirus typu 1 (z ang. *Equine Herpesvirus type 1*)  
**eIF** - czynnik inicjacji translacji (z ang. *eukaryotic initiation factor*)  
**ELISA** - test immunoenzymatyczny (z ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)  
**ER** - retikulum endoplazmatyczne (z ang. *endoplasmic reticulum*)  
**ESCRT** - kompleks sortujący endosomy (z ang. *endosomal sorting complex required for transport*)  
**ET** - domena zewnątrzkomórkowa białka (z ang. *extracellular domain*)  
**F2H** - fluorescencyjny system dwuhybrydowy (z ang. *fluorescent 2-hybrid*)  
**FBS** - płodowa surowica bydłęca (z ang. *fetal bovine serum*)  
**FHV-1** - Koci herpeswirus typu 1 (z ang. *Feline Herpesvirus type 1*)  
**FVR** - zapalenie jamy nosowej i tchawicy kotów (z ang. *feline viral rhinotracheitis*)  
**GFP (EGFP)** - białko zielonej fluorescencji (z ang. *green fluorescent protein*)  
**GST** - glutationo-S-transferaza  
**GTP-aza** - guanozyno-5'trifosfataza (z ang. *guanosine-5'triphosphatase*)  
**GBK** - linia komórek nerki bydłowej Georgia (z ang. *Georgia Bovine Kidney*)  
**gE** - glikoproteina gE

**gE/gI** - kompleks glikoprotein gE i gI  
**gI** - glikoproteina gI  
**HaCaT** - linia komórkowa ludzkich keratynocytów  
**HAV** - wirus zapalenia wątroby typu A (z ang. *hepatitis A virus*)  
**HBS** - sól buforowana HEPES (z ang. *HEPES Buffered Saline*)  
**HCMV** - ludzki wirus cytomegalii (z ang. *human cytomegalovirus*)  
**HCF-1** - czynnik transkrypcyjny HCF-1 (z ang. *host cell factor-1*)  
**HCV** - wirus zapalenia wątroby typu C (z ang. *hepatitis C virus*)  
**HEC-1A** – linia komórek raka endometrium 1A (z ang. *human endometrial cancer-1A*)  
**HeLa** - linia komórek raka szyjki macicy (z ang. *Henrietta Lacks Cells*)  
**HEPES** - kwas hydroksyetylodietylenodiaminoetanolosulfonowy  
**HFF-hTERT** - linia komórkowa fibroblastów napletka z ekspresją telomerazy (z ang. *human foreskin fibroblast -human telomerase reverse transcriptase*)  
**HHV-6** - wirus rumienia nagłego (z ang. *human herpesvirus type 6*)  
**HIV** - ludzki wirus niedoboru odporności (z ang. *human immunodeficiency virus*)  
**HK97** - bakteriofag Hong Kong 97 (z ang. *Escherichia virus Hong Kong 97*)  
**HMPV** - ludzki metapneumowirus (z ang. *Human Metapneumovirus*)  
**hnRNP** - heterogenna rybonukleoproteina (z ang. *heterogeneous ribonucleoprotein*)  
**hpi** - liczba godzin po infekcji (z ang. *hours post infection*)  
**HRP** - peroksydaza chrzanowa (z ang. *horseradish peroxidase*)  
**HSP** - białka szoku termicznego (z ang. *heat-shock proteins*)  
**HSV-1** - wirus opryszczki typu 1 (z ang. *Herpes Simplex Virus type 1*)  
**HSV-2** - wirus opryszczki typu 2 (z ang. *Herpes Simplex Virus type 2*)  
**HTLV-1** - wirus ludzkiej białaczki z komórek T (z ang. *human T-cell leukemia/lymphoma virus*)  
**Huh-7** - linia komórek nowotworowych wątroby (z ang. *human hepatoma-7*)  
**HVEM** - receptor wejścia herpeswirusa (z ang. *herpesvirus entry mediator*)  
**IBR** - zakaźne zapalenie nosa i tchawicy bydła (z ang. *infectious bovine rhinotracheitis*)  
**ICAT** - z ang. *Isotope-coded Affinity Tag*  
**ICP** - z ang. *infected cell protein*  
**IE** - geny bardzo wczesne (z ang. *immediate-early*)  
**IDE** - enzym degradującym insulinę (z ang. *insulin-degrading enzyme*)  
**IF** - immunofluorescencja  
**IFI16** - indukowane interferonem gamma białko 16 (z ang. *gamma-interferon-inducible protein 16*)  
**IFIT** - białko indukowane interferonem z powtórzeniami tetratrikopeptydów (z ang. *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*)  
**IFIX** - białko X indukowane interferonem (z ang. *interferon-inducible protein X*)  
**IFN** - interferon  
**IL** - interleukina  
**IP** - immunoprecypitacja  
**IPMA** - detekcja białek *in situ* w jednowarstwowych hodowlach komórkowych (z ang. *immunoperoxidase monolayer assay*)  
**IPV** - otręt bydła (z ang. *infectious pustular vulvovaginitis*)  
**IR** - sekwencja wewnętrznych powtórzeń w genomie herpeswirusów (ang. *internal repeats*)  
**IRL** - wewnętrzny rejon powtórzeniowy w segmencie UL (z ang. *internal repeats long*)  
**IRS** - wewnętrzny rejon powtórzeniowy w segmencie US (z ang. *internal repeats short*)  
**iTRAQ** - znaczniki izobaryczne (z ang. *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification*)  
**i wsp.** – i współpracownicy  
**KD** - białko pozbawione aktywności kinazowej (z ang. *kinase dead*)  
**kDa** - kilodalton  
**KIF1A** - białko kinezyno-podobne KIF1A (z ang. *kinesin-like protein, kinesin family member 1A*)  
**KN** - komórki nieinfekowane  
**Ko-IP** - koimmunoprecypitacja  
**KOP-R** - linia komórek nabłonkowych gardła i przełyku bydłowego (z niem. *Kalb Oesopharynx*)  
**Kpz** - tysiące par zasad  
**KRAS** - guanozynotrifosfataza K-Ras (z ang. *guanosine triphosphatase K-Ras, Kirsten rat sarcoma protein*)  
**KSHV** - herpeswirus mięsaka Kaposiego (z ang. *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*)  
**L** - geny późne (z ang. *late genes*)

**LAT** - transkrypt związany z latencją (z ang. *latency-associated transcript*)  
**Lgl** - z ang. *lethal giant larvae protein*  
**LR** - gen związany z latencją (z ang. *latency related gene*)  
**Mab** - przeciwciała monoklonalne (z ang. *monoclonal antibodies*)  
**MAPK/ERK** - szlak sygnałowy kinaz aktywowanych mitogenami (z ang. *mitogen-activated protein kinases pathway/extracellular signal-regulated kinases pathway*)  
**MCMV** - myszy cytomegalowirus (z ang. *murine cytomegalovirus*)  
**MCS** - miejsce wielokrotnego klonowania (z ang. *multiple cloning site*)  
**MCP** - duże białko kapsydowe (z ang. *major capsid protein*)  
**MDA5** - z ang. *melanoma differentiation-associated gene 5*  
**MDBK** - linia komórek nabłonkowych nerki bydłowej Madin-Darby (z ang. *Madin-Darby Bovine Kidney*)  
**MDV** - wirus choroby Mareka (z ang. *Marek's disease virus*)  
**MeV** - wirus odry (z ang. *measles virus*)  
**MHC-I** - cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy I (z ang. *major histocompatibility complex*)  
**MHV-68** - myszy gammaherpeswirus 68 (z ang. *murine gammaherpesvirus-68*)  
**miRNA** - mikroRNA  
**MLV** - wirus mysiej białaczki (z ang. *murine leukemia virus*)  
**MOI** - liczba cząstek wirusa przypadająca na jedną komórkę w hodowli (z ang. *multiplicity of infection*)  
**mRFP** - monomeryczne białko czerwonej fluorescencji (z ang. *monomeric red fluorescence protein*)  
**mRNA** - informacyjny RNA (z ang. *messenger RNA*)  
**MSBP** - analiza proteomiczna z wykorzystaniem spektrometrii masowej (z ang. *mass spectrometry-based proteomics*)  
**MWB** - Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed  
**MYOF** - mioferlina  
**NEBD** - model rozkładu błony jądrowej (z ang. *nuclear envelope breakdown*)  
**Nectl** - białko nektynopodobne (z ang. *nectin-like protein*)  
**NP-40** - Nonidet P-40/ oktylofenoksylietanol  
**Oct-1** - białko wiążące oktamer (z ang. *octamer-binding protein 1*)  
**ORF** - otwarta ramka odczytu (z ang. *open reading frame*)  
**OV** - wirusy onkolityczne (z ang. *oncolytic viruses*)  
**PABP** - białko wiążące poli(A) (z ang. *polyadenylate-binding protein 1*)  
**Par** - z ang. *partitioning defective protein*  
**PBS** - sól fizjologiczna buforowana fosforanami  
**PBS-T** - sól fizjologiczna buforowana fosforanami z Tween 20  
**PCR** - reakcja łańcuchowa polimerazy (z ang. *polimerase chain reaction*)  
**PE** - fikoerytryna (z ang. *phycoerythrin*)  
**PFU** - ilość wirusa tworząca łysinki wirusowe (z ang. *plaque forming unit*)  
**PHB-1** - prohibityna-1  
**PIP** - białko oddziałujące z PP1 (z ang. *PP1-interacting protein*)  
**PK15** - linia komórek nabłonkowych nerki świni 15 (z ang. *porcine kidney 15*)  
**PRNT** - test neutralizacji poprzez redukcję ilości łysinek wirusowych (z ang. *plaque reduction neutralization test*)  
**PRRSV** - wirus zespołu rozrodco-oddechowego świń (z ang. *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*)  
**PRV** - wirus wścieklizny rzekomej (z ang. *Pseudorabies Virus*)  
**PVDF** - polifluorek winylidenu (z ang. *polyvinylidene fluoride*)  
**PP1** - białkowa fosfataza 1 (z ang. *protein phosphatase 1*)  
**PP1 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$**  - podjednostka katalityczna alfa/beta/gamma/delta białkowej fosfatazy 1 (z ang. *protein phosphatase 1 catalytic subunit  $\alpha/\beta/\gamma/\delta$* )  
**PP1CA** - gen kodujący podjednostkę katalityczną alfa białkowej fosfatazy 1  
**PPN** - przestrzeń perinuklearna  
**PTP1B** - białkowa fosfataza tyrozynowa (ang. *protein tyrosine phosphatase 1B*)  
**QKI** - z ang. *protein quaking*  
**Rac1** - z ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*  
**Rbl-2** - z ang. *retinoblastoma-like protein 2*  
**RhoA** - z ang. *Ras homolog family member A*  
**RIPPO** - białko regulatorowe oddziałujące z PP1 (z ang. *regulatory interactors of protein phosphatase one*)



**RNA** - kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid)  
**RFP** - białko czerwonej fluorescencji (ang. red fluorescent protein)  
**RocA** - rokaglamid A  
**rpm** - liczba obrotów na minutę (ang. revolutions per minute)  
**RSV** - syncytialny wirus oddechowy (z ang. *respiratory syncytial virus*)  
**RV** - wirus wścieklizny (z ang. *rabies virus*)  
**Ryc.** - rycina  
**SARS-CoV-2** - koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego 2 (z ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)  
**SDS** - sól sodowa siarczanu dodecylu  
**SDS-PAGE** - elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach denaturujących (z ang. *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*)  
**SILAC** - znakowanie stabilnym izotopem w hodowli komórkowej (z ang. *Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Culture*)  
**siRNA** - mały interferujący RNA (z ang. *small interfering RNA*)  
**SLiM** - krótki motyw liniowy sekwencji aminokwasowej (z ang. *small/short linear motifs*)  
**SP** - sekwencja sygnałowa białka (z ang. *signal peptide*)  
**ST** - linia komórkowa fibroblastów jąder świni (z ang. *swine testicular cell line*)  
**STAT1** - z ang. *signal transducer and activator of transcription 1*  
**Tab.** - tabela  
**TAE** - bufor tris-octanowy (z ang. *tris-acetate buffer*)  
**TBS** - sól fizjologiczna buforowana trisem (z ang. *tris buffered saline*)  
**TBS-T** - sól fizjologiczna buforowana trisem z Tween 20  
**TEMED** - N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina  
**TGN** - sieć trans aparatu Golgiego (z ang. *trans-Golgi network*)  
**TJ** - połączenia ściste (z ang. *tight junctions*)  
**TM** - domena przezbłonowa białka (z ang. *transmembrane domain*)  
**TNT** - międzykomórkowe nanorurki (z ang. *tunneling nanotubes*)  
**TorA** - torsyna A (z ang. *torsin A*)  
**TR** - sekwencja zewnętrznych powtórzeń genomu herpeswirusów (ang. *terminal repeats*)  
**TRL** - zewnętrzny rejon powtórzeniowy w segmencie UL (z ang. *terminal repeats long*)  
**TROPPO** - sekwencja aminokwasowa białka UL21 dokująca PP1α (z ang. *twenty-one recruitment of protein phosphatase one*)  
**TRS** - zewnętrzny rejon powtórzeniowy w segmencie US (z ang. *terminal repeats short*)  
**Tris** - trihydroksyetylenoaminometan  
**US** - unikatowy krótki segment kodujący genomu herpeswirusów (z ang. *unique short segment*)  
**US3** - kinaza serynowo-treoninowa kodowana przez trzecią ramkę odczytu w segmencie unikatowym krótkim genomu alfaherpeswirusów  
**us3** – gen kodujący kinazę serynowo-treoninową US3  
**UL** - unikatowy długi segment kodujący genomu herpeswirusów (z ang. *unique long segment*)  
**ul35** – gen kodujący białko VP26 alfaherpeswirusów  
**ul36** – gen kodujący białko UL36 (VP1/2) alfaherpeswirusów  
**Vero** - linia komórek nabłonkowych nerki kotawca (z esper. *verda reno*)  
**vhs** - z ang. *virion host shutoff protein*  
**VP** - białko wirusowe (z ang. *viral protein*)  
**VP26** - małe białko kapsydowe alfaherpeswirusów (z ang. *viral protein 26*)  
**VS** - synapsa wirusologiczna (z ang. *virological synapse*)  
**VV** - wirus krowianki (z ang. *vaccinia virus*)  
**VZV** - wirus ospy wietrznej i półpaśca (z ang. *Varicella-Zoster Virus*)  
**WT** - typ dziki (z ang. *wild type*)  
**z ang.** - z angielskiego  
**ZBMW** - Zakład Biologii Molekularnej Wirusów MWB UG-GUMed  
**z esper.** - z esperanto  
**z niem.** - z niemieckiego  
**ZO-1** - białko obwódki zamykającej-1 (z ang. *zonula occludens-1*)  
**YFP** - białko żółtej fluorescencji (z ang. *yellow fluorescent protein*)

## 2. Streszczenie

Bardzo ważnym etapem cyklu replikacyjnego wirusów jest uwalnianie wirionów potomnych w celu zainfekowania kolejnych komórek lub gospodarzy. Typową dla wszystkich wirusów drogą transmisji jest infekcja kolejnych komórek ze środowiska zewnątrzkomórkowego (z ang. *cell-free entry*, CFE), poprzez wiązanie specyficznych dla nich receptorów. By przezwyciężyć napotymane w organizmie bariery fizykochemiczne, kinetyczne oraz immunologiczne, poza CFE wirusy rozwinęły także bardziej złożony typ rozprzestrzeniania się – bezpośredni transport międzykomórkowy (z ang. *cell-to-cell spread*, zwaną dalej CTC). Proces CTC pozwala na przechodzenie wirionów do komórek sąsiadujących w środowisku przeciwciał neutralizujących wirusa. Do tej pory w literaturze naukowej opisano dziewięć mechanizmów CTC, z czego sześć dotyczy alfaherpeswirusów. Kluczową rolę w transmisji CTC wirusów z tej podrodziny pełnią glikoproteiny osłonkowe oraz kinaza US3.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było dokładniejsze poznanie roli kompleksu glikoprotein gE/gI oraz kinazy US3 w procesie CTC alfaherpeswirusów. Modelowym wirusem w podjętych badaniach był bydlęcy herpeswirus typu 1 (z ang. *bovine herpesvirus type*, BHV-1), który ze względu na podobieństwo do alfaherpeswirusów ludzkich, stanowi doskonały i bezpieczny model do badań modyfikacji środowiska komórkowego przez infekcję wirusową.

Pracę badawczą podzielono na dwa etapy - analizę przyżyciową rozprzestrzeniania się fluorescencyjnych rekombinantów wirusowych na drodze CTC w hodowlach komórkowych oraz badanie oddziaływania kompleksu gE/gI z białkami komórkowymi w tym procesie.

W pierwszym etapie opracowano uniwersalny test na określenie tempa procesu CTC fluorescencyjnych rekombinantów wirusowych, polegający na zliczaniu pojedynczych komórek ulegających infekcji w czasie rzeczywistym. Test ten zapewnia bardziej wiarygodne i powtarzalne wyniki niż klasyczny test polegający na pomiarze wielkości łośnek wirusowych. Obserwacje mikroskopowe wykonane przy użyciu tego testu dostarczyły nowych informacji o roli kinazy US3 na początkowych etapach infekcji wirusem BHV-1.

Następnie skonstruowano znakowane fluorescencyjnie rekombinanty wirusowe. W rekombinancie BHV-1 VP26-mCherry gen kodujący małe białko kapsydowe VP26 powiązано ze znacznikiem mCherry, a w podwójnie fluorescencyjnym rekombinancie BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry białko GFP było przyłączone do glikoproteiny osłonkowej gE. Użycie tych mutantów umożliwiło bezpośrednie obserwacje transportu elementów strukturalnych wirusa w połączeniach międzykomórkowych.

W drugim etapie pracy zidentyfikowano siedemnaście białek potencjalnie oddziałujących z kompleksem gE/gI. Do tej analizy wykorzystano spektrometrię masową z wykorzystaniem potrójnego znakowania stabilnym izotopem w hodowli komórkowej (z ang. *Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Culture*, SILAC). Pośród białek interaktomu, największy stosunek wzbogacania określono dla podjednostki katalitycznej  $\alpha$  białkowej fosfatazy 1 (PP1 $\alpha$ ). W dalszych eksperymentach potwierdzono, iż białko PP1 $\alpha$  koimmunoprecypitowało z glikoproteinami gE oraz gI w trzech typach infekowanych komórek oraz że kompleks gE/gI i białko PP1 $\alpha$  kolokalizowały w obrębie błony komórkowej i międzykomórkowych nanorurek. Wykluczono natomiast bezpośrednią interakcję gE oraz PP1 $\alpha$ , co świadczy o tym, że konieczna jest obecność glikoproteiny gI lub innych białek wirusowych do zajścia tego oddziaływania.

Podsumowując, podjęte badania przyczyniły się do dokładniejszego poznania procesu CTC wirusa BHV-1, a w szczególności jego dynamiki oraz roli białek wirusowych i komórkowych w tym typie transmisji.

### 3. Abstract

One of the most important steps in the virus replication cycle is the release of progeny virions to infect other cells or hosts. A typical route of transmission for all viruses is the cell-free entry (CFE), in which viruses infect target cells from the extracellular environment by binding specific receptors. To evade physicochemical, kinetic, and immunological barriers in the host organism, apart from CFE viruses developed a more complex type of transmission - cell-to-cell spread (CTC). The CTC process allows the direct transmission of virions from infected cells to adjacent cells in the presence of neutralizing antibodies. To date, nine CTC mechanisms have been described in the scientific literature, six of which are related to alphaherpesvirus infection. The envelope glycoproteins and the US3 kinase play a key role in the CTC transmission of viruses from this subfamily.

The aim of this PhD thesis was better understanding of the role of the gE/gI glycoprotein complex and the US3 kinase in the CTC process of alphaherpesviruses. The model virus in these studies was bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), which due to its similarity to human alphaherpesviruses, is an excellent and safe model for studying the modification of the cellular environment by viral infection.

The research was divided into two stages - live analysis of the spread of fluorescent viral recombinants by CTC in cell cultures and the study of the interaction of the gE/gI complex with cellular proteins in this process.

In the first step, a universal test was developed to determine the rate of the CTC process of fluorescent viral recombinants, which was based on the real-time counting of single infected cells. Unlike the classical viral plaque size assay, this analysis provided the space-time context of the CTC process and a reliable and reproducible results. Furthermore, microscopic observations provided new information on the role of US3 kinase in the initial stages of BHV-1 infection.

Additionally, two viral recombinants were constructed, both carrying the gene encoding a small capsid protein VP26 fused to the mCherry fluorophore - BHV-1 VP26-mCherry and BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry. The fluorescent recombinants were used for direct studies of the transport of structural elements of the virus in intercellular connections.

In the second step of the research, seventeen proteins potentially interacting with the gE/gI complex were identified by mass- spectrometry utilizing Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Culture (SILAC). Among the cellular interactome, the highest enrichment ratio was found for the  $\alpha$  catalytic subunit of protein phosphatase 1 (PP1 $\alpha$ ). It was confirmed in further experiments that PP1 $\alpha$  protein co-immunoprecipitated with gE and gI glycoproteins in three types of infected cells, and that the gE/gI complex and PP1 $\alpha$  co-localized within the cell membrane and tunneling nanotubes. However, a direct interaction of gE and PP1 $\alpha$  was excluded, which indicates that the presence of glycoprotein gI or of other viral proteins is necessary for this interaction.

Overall, the research presented in this thesis contributed to a more detailed understanding of the BHV-1 CTC process, in particular its dynamics and the role of viral and cellular proteins in this type of transmission.

## 4. Wstęp

### 4.1 Alfaherpeswirusy - systematyka i przebieg infekcji

Pierwsze doniesienia o herpeswirusach mogą być datowane nawet na kilka tysięcy lat przed naszą erą. Już na sumeryjskich tablicach czy też w papirusie Ebersa znalazły się opisy tajemniczych wyprysków, które przypominają te, powodowane infekcją herpeswirusową. Sama nazwa „herpes” sięga starożytności i wywodzi się od greckiego słowa „herpeton”, co oznacza pełzać. Została pierwszy raz użyta przez ojca medycyny - Hipokratesa dla opisu ropiejących owrzodzeń, które zdawały się pełzać na powierzchni skóry. Do XVII wieku, określenia „herpes” używało się w odniesieniu do wielu różnych dolegliwości skórnych. Sytuacja zmieniła się za rządów Ludwika XIV, który zlecił swojemu nadwornemu lekarzowi Jeanowi Astruc kontrolę zdrowia francuskich prostytutek. Astruc użył terminu *herpes genitalis*, dla odróżnienia zespołu objawów innych niż charakterystycznych dla syfilis [1]. W 1883 roku Unna, jako jeden z pierwszych, zwrócił uwagę na nawrotowy charakter *herpes genitalis*. Pod koniec XIX wieku, pojawiły się pierwsze wytyczne dotyczące diagnozy oraz leczenia choroby. W latach 40-tych XX wieku wykazano, że wirus opryszczki ludzkiej (*Herpes Simplex*, HSV) jest czynnikiem infekcyjnym w *herpes genitalis* [2]. W latach 60-tych XX wieku, Schneweis i wsp. zidentyfikowali dwa serotypy wirusa ludzkiej opryszczki - HSV-1 oraz HSV-2, które później zostały uznane za dwa różne gatunki przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (z ang. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) [3]. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (z ang. *World Health Organization*, WHO) z 2012 roku, 67% populacji ludzkiej poniżej 50-tego roku życia jest nosicielami HSV-1, a ok. 11% wirusa HSV-2 [4]. Wirus HSV-1 jest odpowiedzialny za infekcje okolicy ust, twarzy i rzadziej genitaliów. HSV-2 natomiast częściej powoduje infekcje genitalne. Poza owrzodzeniami, w wyjątkowych przypadkach wirus opryszczki może doprowadzić do zapalenia opon mózgowych, zapalenia rogówki, czy też, w przypadku noworodków, niepełnosprawności lub nawet śmierci. Szczególnie podatne na powikłania są osoby z niedoborami odporności, tak jak nosiciele ludzkiego wirusa niedoboru odporności (z ang. *human immunodeficiency virus*, HIV), pacjenci onkologiczni po radioterapii lub osoby przyjmujące leki immunosupresyjne.

Ponadto nosiciele wirusa HSV-2 są trzykrotnie bardziej narażeni na infekcje wirusem HIV [4].

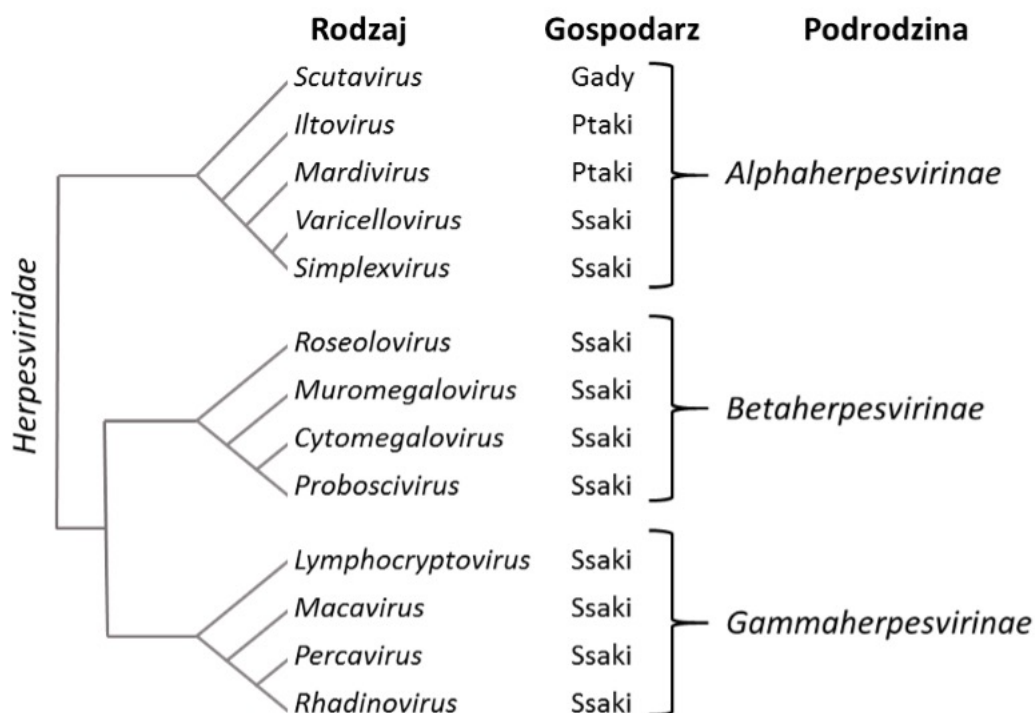
Obecnie wiadomo, że rodzina *Herpesviridae* liczy ponad 100 gatunków wirusów, będących patogenami ssaków, ptaków oraz gadów [5], [6]. Większość z nich stanowią wirusy zwierzęce (jedynie dziewięć gatunków infekuje ludzi). Herpeswirusy zwierzęce powodują groźne choroby u swoich gospodarzy, które corocznie przynoszą ogromne straty w chowie i hodowlach zwierząt.

#### 4.1.1 Systematyka herpeswirusów i jednostki chorobowe

Rodzina *Herpesviridae* należy do rzędu *Herpesvirales*. Wszystkim członkom tej rodziny można przypisać cztery charakterystyczne cechy biologiczne [7]:

- (i) Szeroki wachlarz enzymów zaangażowanych w metabolizm kwasów nukleinowych (np. kinazy tymidynowe, dUTPazy, reduktazy rybonukleotydowe), syntezę DNA (np. polimerazy, helikazy, prymazy) oraz modyfikację białek (np. kinazy).
- (ii) Lokalizacja jądrowa transkrypcji genów wirusowych, syntezy wirusowego DNA oraz składania nukleokapsydu. Nabycie przynajmniej części tegumentu oraz opłaszczanie osłonką w cytoplazmie.
- (iii) Liza zainfekowanej komórki na skutek produkcji wirionów potomnych.
- (iv) Przejście w stan uśpienia - tzw. latencji komórkowej, które zapewnia przetrwanie wirusów w organizmie gospodarza do końca jego życia.

W skład rodziny *Herpesviridae* wchodzi trzy podrodziny - *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* oraz *Gammaherpesvirinae* [8]. W odróżnieniu od *Beta-* i *Gammaherpesvirinae*, w rodzinie *Alphaherpesvirinae* zgrupowane są zarówno patogeny ssaków, ptaków oraz gadów (**Ryc. 1**). McGeoch i wsp. zasugerowali, że różnorodna specyfika gatunkowa gospodarzy w obrębie tej podrodziny jest częściowo powodowana koewolucją alfaherpeswirusów z gadami oraz dywergencją linii ptaków i ssaków [9].



**Ryc. 1: Pokrewieństwo filogenetyczne rodziny *Herpesviridae* oraz zakres gospodarzy poszczególnych rodzajów.** Pominięto gatunki niesklasyfikowane do rodzajów. Gałęzie drzewa nie odzwierciedlają dystansu genetycznego.

Podrodzinę *Alphaherpesvirinae* charakteryzuje zróżnicowany zakres gospodarzy, krótki cykl replikacyjny, szybkie rozprzestrzenianie się w hodowli komórkowej, liza zainfekowanych komórek oraz przejście w stan latencji w komórkach nerwowych (głównie nerwów czuciowych). Jest to największa podrodzina herpeswirusów, do której należy aż 45 gatunków [5], [6]. W podrodzinie można wyróżnić pięć rodzajów - *Varicellovirus* i *Simplexvirus* - zawierające patogeny ssaków, *Mardivirus* i *Iltovirus* - obejmujące wirusy ptasie oraz utworzony w 2011 roku – *Scutavirus* – zawierający dwa wirusy gadzie. Poza tym do tej podrodziny zalicza się, nieprzypisany do żadnego z rodzajów, herpeswirus ChHV-6, atakujący żółwie.

W odróżnieniu od alfaherpeswirusów, przedstawicieli podrodziny *Betaherpesvirinae* charakteryzuje wąski zakres gospodarzy, wydłużony cykl replikacyjny (ponad 7 dni) i wolno postępująca infekcja komórek w hodowli. Betaherpeswirusy przechodzą w stan latencji w gruczołach, nerkach, komórkach układu limfatycznego i innych tkankach.



*Gammaherpesvirinae* charakteryzuje wąski zakres gospodarzy, ograniczony do reprezentantów jednej rodziny lub rodzaju. Gammaherpeswirusy infekują głównie limfocyty i zazwyczaj są specyficzne wobec limfocytów T lub B. Tylko niektóre z nich są w stanie litycznie zainfekować fibroblasty lub komórki nabłonkowe. Bardzo specyficzną cechą przedstawicieli tej podrodziny jest przechodzenie w stan latencji wyłącznie w limfocytach.

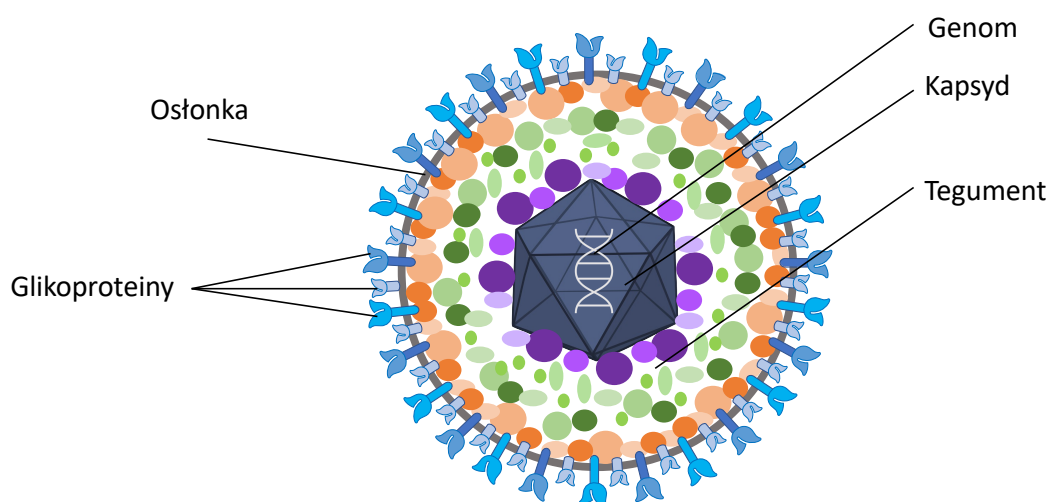
W **tabeli 1** przedstawiono przykłady wirusów należących do poszczególnych podrodzin wraz z powodowanymi przez nie chorobami.

**Tab. 1:** Przykładowe gatunki wirusów w trzech podrodzinach *Herpesviridae* oraz powodowane przez nie choroby.

<b>Podrodzina</b>	<b>Przykłady wirusów</b>	<b>Jednostka chorobowa</b>
<b><i>Alphaherpesvirinae</i></b>	Wirus opryszczki ludzkiej typu 1 (HHV-1, HSV-1)	Opryszczka wargowa
	Wirus opryszczki ludzkiej typu 2 (HHV-2, HSV-2)	Opryszczka genitalna
	Wirus ospy wietrznej i półpaśca (HHV-3, VZV)	Ospa wietrzna, półpasiec
	Wirus wścieklizny rzekomej (SuHV-1, PRV)	Choroba Aujeszkiego
	Bydlęcy herpeswirus typu 1 (BoHV-1, BHV-1)	Zakaźne zapalenie nosa i tchawicy bydła (IBR); otręt bydła (IPV)
	Koci herpeswirus typu 1 (FeHV-1, FHV-1)	Zapalenie jamy nosowej i tchawicy kotów (FVR)
	Koński herpeswirus typu 1 (EHV-1)	Zakaźne ronienie kłaczy
	Kurzy herpeswirus typu 2 (GaHV-2, MDV-1)	Choroba Mareka
<b><i>Betaherpesvirinae</i></b>	Cytomegalowirus (HHV-5, HCMV, CMV)	Cytomegalia
	Wirus rumienia nagłego (HHV-6)	Rumień nagły
<b><i>Gammaherpesvirinae</i></b>	Wirus Epsteina-Barra (HHV-4, EBV)	Mononukleozą zakaźną
	Wirus mięsaka Kaposiego (HHV-8, KSHV)	Mięsak Kaposiego

#### 4.1.2 Budowa wirionów i organizacja genomu

Wszystkie alfaherpeswirusy charakteryzuje podobna budowa wirionów. Są to wirusy o średnicy ok. 150-260 nm. Posiadają osłonkę lipidowo-białkową z zakotwiczonymi w niej glikoproteinami wirusowymi. Genom w postaci dwuniciowego DNA w formie liniowej upakowany jest w ikozaedralny kapsyd [10]. Pomędzy kapsydem a osłonką znajduje się charakterystyczna dla herpeswirusów warstwa tegumentu, złożona z białek wirusowych i komórkowych oraz mRNA [11]–[13] (**Ryc. 2**).



**Ryc. 2: Schemat budowy wirionu alfaherpeswirusów.** Kolorem pomarańczowym zaznaczono białka zewnętrznego tegumentu, zielonym: białka środkowego tegumentu, fioletowym: białka wewnętrznego tegumentu.

#### Kapsyd

Kapsyd składa się głównie z białka VP5, formującego 162 kapsomery, w tym 150 heksamerów i 11 pentamerów. Kapsomery pentameryczne rozmieszczone są na 11 wierzchołkach kapsydu. Dwunasty wierzchołek, w miejscu pentameru, zawiera portal w postaci pierścienia złożonego z 12 kopii białka UL6 [14]. Na każdą kopię VP5 formującą heksamer przypada jedna kopia małego białka kapsydowego VP26 (UL35), co daje 900 kopii na każdy kapsyd. Przerwy między kapsomerami wypełnia potrójny kompleks białek VP19c oraz VP23 [15]. Pentamery, nadają kapsydowi sztywność, dzięki wzmocnieniu przez białka UL17, UL25 [16], [17] oraz tegumentowe białko UL36 (VP1/2) [18]–[22].

Wnętrze kapsydu wypełnia głównie ciasno upakowany genom, co związane jest z dużym ciśnieniem wewnątrz tej struktury [23]. Jedynym poznanym białkiem,

znajdującym się we wnętrzu kapsydu, jest proteaza VP24 [12], [24]–[28], która przecina białka wypełniające kapsyd, by umożliwić upakowanie genomu do jego wnętrza [29]–[31]. Udział VP24 w uwolnieniu genomu z kapsydu, pomimo licznych sugestii, nie został do tej pory udowodniony [32].

### Tegument

Termin tegument został po raz pierwszy użyty przez Roizmana i Furlonga [33] do opisu białkowej, asymetrycznie rozmieszczonej warstwy, znajdującej się pomiędzy kapsydem a osłonką herpeswirusów. Jest to struktura analogiczna do białek macierzy (z ang. *matrix proteins*) innych wirusów osłonkowych, które pełnią kluczową rolę w tworzeniu osłonki wtórnej (z ang. *secondary envelopment*). W porównaniu do białek macierzy, tegument jest znacznie bardziej skomplikowaną składową wirionu. Składa się z ponad 20 różnych białek wirusowych, formujących rozległą sieć interakcji [34]. Większość białek tegumentu pełni funkcje regulatorowe lub posiada aktywność enzymatyczną, która wykorzystywana jest na wczesnych etapach infekcji wirusowej. Przykładami takich białek są kinazy (UL13, US3, UL23), endonukleaza RNA vhs/UL41 (z ang. *virion host shutoff protein*) biorąca udział w regulacji transkrypcji genów wirusowych i komórkowych, dUTPaza UL50 czy regulator transkrypcji ICP4 (z ang. *infected cell protein 4*).

Białka tegumentu podzielone są na trzy grupy: (I) białka wewnętrznego tegumentu (powiązane z kapsydem), (II) białka zewnętrznego tegumentu (powiązane z osłonką) oraz (III) białka środkowego tegumentu (znajdujące się pomiędzy warstwami zewnętrzną i wewnętrzną) [35]. Białka środkowego tegumentu stanowią największą część tej struktury, są konserwowane wśród alfaherpeswirusów, ale paradoksalnie nie są niezbędne do powstania infekcyjnych cząstek wirusowych [35]. Największym białkiem tegumentu jest UL36 (VP1/2), które bezpośrednio łączy kapsyd z tegumentem [10].

### Ostonka

Ostonkę herpeswirusów stanowi dwuwarstwowa błona lipidowo-białkowa pochodzenia komórkowego, z zakotwiczonymi w niej białkami wirusowymi oraz komórkowymi. Główną funkcją osłonki jest umożliwienie wnikania wirusa do komórki gospodarza poprzez wiązanie receptorów na powierzchni komórki oraz fuzja z błoną

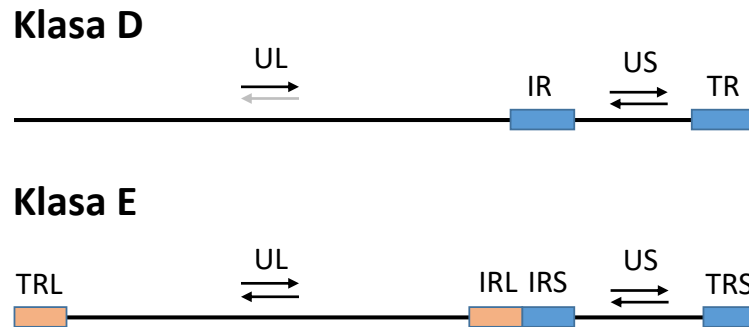
komórkową [36]. Poza tym osłonka chroni wiriony przed układem dopełniacza oraz przeciwciałami neutralizującymi [37], [38], a także wywołuje zmiany w architekturze tegumentu bezpośrednio przed wniknięciem wirusa do komórki [39].

Większość białek osłonki to glikoproteiny wirusowe, których ilość oraz typ różni się w zależności od konkretnego alfa herpeswirusa, wśród nich można wyróżnić m.in.: gB, gC, gD (z wyjątkiem wirusa VZV [40]), gE, gH, gI, gK oraz gL. Glikoproteiny syntetyzowane są w siateczce śródplazmatycznej (z ang. *endoplasmic reticulum*, ER), po czym transportowane są do aparatu Golgiego, a następnie na powierzchnię komórki gospodarza. W kolejnym etapie ulegają endocytozie i kierowane są do sieci *trans* aparatu Golgiego, do miejsc tworzenia osłonki wtórnej [41].

Najbardziej konserwowaną glikoproteiną wśród herpeswirusów jest gB. Podobieństwo sekwencji aminokwasowej tego białka w obrębie każdej z podrodzin utrzymuje się na poziomie ~50% [42].

### Organizacja genomu

Genom herpeswirusów stanowi dwuniciowa cząsteczka liniowego DNA, ulegająca cyrkularyzacji zaraz po uwolnieniu z kapsydu w jądrze zainfekowanej komórki. Długość genomu alfa herpeswirusów to ok. 124-180 kbp, ze średnią zawartością par GC na poziomie 31-77% [43]–[47]. Genomy alfa herpeswirusów posiadają dwa unikatowe segmenty – długi (z ang. *Unique Long*, UL) oraz krótki (z ang. *Unique Short*, US). Segmenty rozdzielają zewnętrzne rejony powtórzeniowe (z ang. *Terminal Repeats*, TR) oraz wewnętrzne rejony powtórzeniowe (z ang. *Internal Repeats*, IR), różniące się w zależności od wirusa długością oraz sekwencją nukleotydową. Ze względu na ilość oraz lokalizację rejonów powtórzeniowych, genomy herpeswirusów można podzielić na sześć klas, oznaczonych literami od A do F [7]. W podrodzinie *Alphaherpesvirinae* wyróżnia się dwie klasy genomów – klasę D, charakterystyczną dla rodzajów *Varicellovirus* [48] i *Scutavirus* [47] oraz klasę E, przypisaną rodzajom *Simplexvirus* [48] i *Mardivirus* [49]. Rejony powtórzeniowe mogą ulegać rekombinacji, która prowadzi do powstania izomerycznych form genomów. W przypadku klasy E powstają cztery izomery, ze względu na zmienną orientację rejonów US i UL. W klasie D znacznie częściej odwróceniu ulega rejon US, co prowadzi do powstania dwóch izomerów genomu [50] (**Ryc.3**).



**Ryc. 3: Schemat organizacji genomów alfaherpeswirusów** - genomy klasy D charakterystyczne są dla rodzajów *Varicellovirus* i *Scutavirus*; genomy klasy E charakterystyczne są dla rodzajów *Simplexvirus* i *Mardivirus*. Czarnymi strzałkami oznaczono możliwe orientacje segmentów US i UL. Strzałką szarą oznaczono rzadko spotykaną rearanżację rejonu UL w genomach klasy D. IR - wewnętrzny rejon powtórzeniowy; TR - zewnętrzny rejon powtórzeniowy; IRL - wewnętrzny rejon powtórzeniowy w segmencie UL; IRS - wewnętrzny rejon powtórzeniowy w segmencie US; TRL - zewnętrzny rejon powtórzeniowy w segmencie UL; TRS - zewnętrzny rejon powtórzeniowy w segmencie US.

#### 4.1.3 Cykl replikacyjny

W cyklu replikacyjnym alfaherpeswirusów można wyróżnić trzy główne etapy:

- I. Inicjacja infekcji – etap od wnikięcia wirusa do komórki poprzez wiązanie receptorów do oddziaływania genomu wirusowego z czynnikami transkrypcyjnymi gospodarza.
- II. Cykl lityczny – etap wytwarzania wirionów potomnych zdolnych do infekcji innych komórek i gospodarzy.
- III. Latencja – stan uśpienia w neuronach obwodowego układu nerwowego trwający do momentu reaktywacji wirusa.

##### Inicjacja infekcji

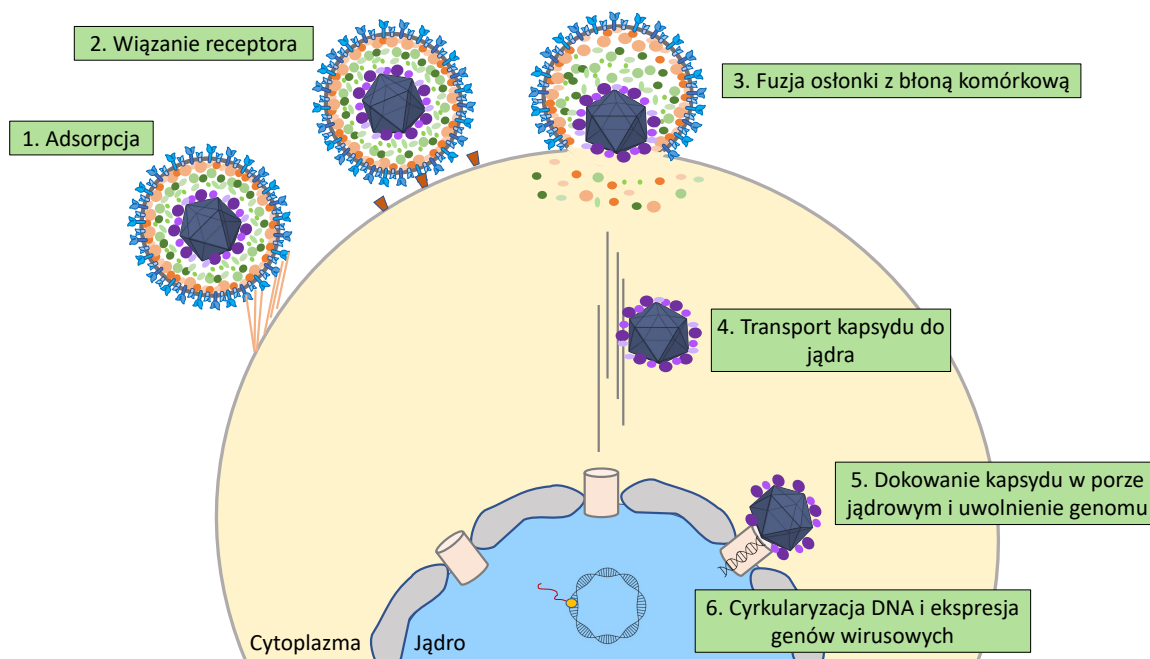
Do pierwszego etapu infekcji alfaherpeswirusy wykorzystują glikoproteiny osłonkowe. W odróżnieniu od innych wirusów, posiadają one oddzielne białka dedykowane wiązaniu receptorów i fuzji błon. Współpraca tych białek jest kluczowa do wnikięcia wirusa do komórki przez błonę komórkową lub za pośrednictwem endosomów.

Proces wnikania rozpoczyna się od adsorpcji wirusa na powierzchni komórki poprzez wiązanie proteoglikanów przez glikoproteiny gC i/lub gB [51]–[54]. Adsorpcja jest

odwracalna i nie powoduje fuzji błon [7]. Ten etap nie jest również absolutnie konieczny do wnikięcia wirusa, ponieważ komórki pozbawione siarczynu heparanu również mogą ulegać infekcji [55].

W kolejnym etapie, u większości alfaherpeswirusów dochodzi do związania specyficznego receptora przez białko gD, co doprowadza do zmiany jego konformacji. Związanie receptora przez gD stanowi sygnał dla heterodimeru gH/gL. Kompleks gH/gL doprowadza do zmian konformacyjnych w białku gB, które skutkują fuzją ostonki wirusowej i błony komórkowej gospodarza, a co za tym idzie wnikięciem kapsydu oraz tegumentu do cytoplazmy [56].

Po wnikięciu do cytoplazmy, większość białek tegumentu zostaje uwolniona do cytozolu. Następnie kapsydy wraz z częścią tegumentu (głównie białkami UL36, UL37, US3) transportowane są za pośrednictwem mikrotubuli do porów błony jądrowej [57]. W kolejnym etapie dochodzi do dokowania kapsydów w porach przy udziale komórkowych nukleoporyn oraz importyny-beta [58]–[60]. Pojedynczy kapsyd skierowany jest wierzchołkiem do wnętrza poru jądrowego [59], [61]. Biorąc pod uwagę podobieństwo w budowie kapsydu herpeswirusów do bakteriofagów *Caudovirales*, wierzchołek dokujący może być portalem, służącym do uwolnienia genomu bezpośrednio do porów jądrowych [62]. Dokładny mechanizm dokowania jednak nie został do tej pory poznany. Po insercji genomu do wnętrza jądra, kapsyd pozostaje zakotwiczony w błonie jądrowej, w niezmienionej morfologicznie formie [59], [61] (**Ryc. 4**). Zaraz po wnikięciu do jądra komórkowego, wirusowy dsDNA ulega cyrkularyzacji i wiązaniu przez białka histonowe. Następnie dochodzi do aktywacji ekspresji genów wirusowych [63].



**Ryc. 4: Inicjacja infekcji alfaherpeswirusów.** Na schemacie zilustrowano kolejne etapy wnikania wirusów do wnętrza komórki.

### Cykl lityczny

Geny alfaherpeswirusów ulegają ekspresji kaskadowo. Jako pierwsze transkrybowane są geny bardzo wczesne (z ang. *immediate-early*, IE), zwane również genami alfa (z ang.  $\alpha$ -genes). Następnie aktywowana jest ekspresja genów wczesnych (z ang. *early*, E), inaczej genów beta (z ang.  $\beta$ -genes). Na końcowym etapie dochodzi do transkrypcji genów późnych (z ang. *late*, L), czyli genów gamma (z ang.  $\gamma$ -genes) [64].

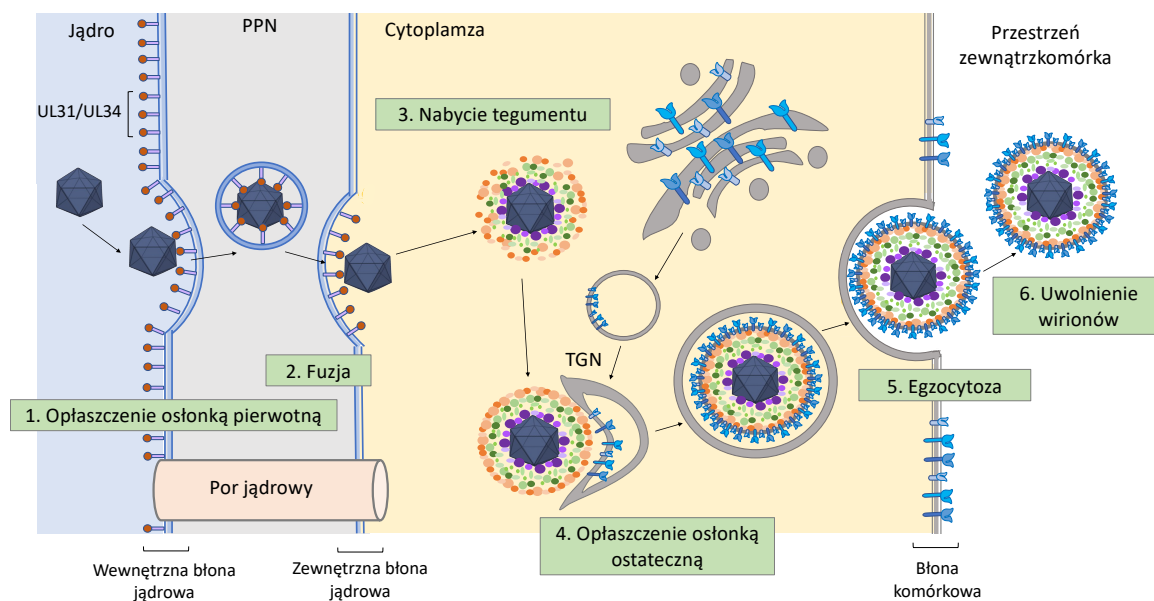
Ekspresja genów IE zachodzi dzięki wirusowemu białku VP16 (UL48,  $\alpha$ TIF), które wraz z komórkowymi białkami HCF-1 (z ang. *host cell factor-1*) oraz Oct-1 (z ang. *octamer-binding protein 1*) formuje kompleks wiążący się w rejonach promotorowych tych genów [65]. Następnie do powyższego kompleksu rekrutowane są komórkowe czynniki transkrypcyjne. Produkty genów IE to białka regulatorowe zaangażowane głównie w aktywację transkrypcji genów E, modulowanie cyklu komórkowego i struktury chromatyny, transport i splicing RNA oraz hamowanie odpowiedzi immunologicznej [7]. Geny E kodują białka zaangażowane w replikację genomu wirusowego, m. in. wirusową polimerazę DNA, helikazę oraz prymazę [66]. Dopiero po replikacji DNA wirusowego dochodzi do ekspresji genów L, których produkty to białka strukturalne wirusa (tj. glikoproteiny osłonkowe, białka kapsydowe oraz białka tegumentu) [7].

Składanie kapsydów wirusowych oraz upakowanie do nich nowo zsyntetyzowanych kopii genomu zachodzi w jądrze komórkowym [64]. Genom wirusowy pakowany jest do kapsydu przez portal złożony z 12 kopii białka UL6, obecny na jednym z jego wierzchołków [14]. Następnie, kapsydy opuszczają jądro, by uformować dojrzałe wiriony w cytoplazmie zainfekowanej komórki.

Ze względu na fakt, iż kapsydy mają średnicę ok. 125 nm, są zbyt duże, aby opuścić jądro przez pory jądrowe, których średnica nie przekracza ok. 39 nm [67]. W związku z tym musi istnieć inna, bardziej skomplikowana droga ucieczki dojrzałych kapsydów do cytoplazmy. Ponieważ mechanizm tego procesu stanowi wciąż element sporny wśród naukowców, istnieją trzy modele tłumaczące ten etap infekcji [64]: (I) model rozkładu błony jądrowej (z ang. *nuclear envelope breakdown*, NEBD), (II) model podwójnego opłaszczania (z ang. *dual envelopment* lub *envelopment/de-envelopment*), (III) model pojedynczego opłaszczania w cytoplazmie (z ang. *singiel cytoplasmic envelopment*). Najwięcej dowodów naukowych przemawia za modelem podwójnego opłaszczania, dlatego zostanie on omówiony najbardziej szczegółowo.

Jądro komórkowe otoczone jest podwójną błoną złożoną z wewnętrznej oraz zewnętrznej błony jądrowej, pomiędzy którymi znajduje się przestrzeń perinuklearna. Za proces opuszczenia jądra w modelu podwójnego opłaszczania odpowiadają białka UL31 oraz UL34, których analogi występują we wszystkich podrodzinach herpeswirusów [68]–[70]. UL31 formuje kompleks z UL34, który kierowany jest z cytoplazmy do jądra, gdzie umożliwia opłaszczanie kapsydów wewnętrzną błoną jądrową oraz ich przejście do przestrzeni perinuklearnej, jest to tzw. nabycie osłonki pierwotnej (z ang. *primary envelopment*) [69]–[71]. Następnie osłonka pierwotna ulega fuzji z zewnętrzną błoną jądrową, po czym pozbawione osłonki kapsydy wydostają się do cytoplazmy (z ang. *de-envelopment*). W kolejnym etapie kapsydy nabywają tegument oraz osłonkę ostateczną (z ang. *secondary envelopment*) [35]. Końcowo, dojrzałe wiriony wydostają się z komórki na drodze egzocytozy [72] (**Ryc. 5**).





**Ryc. 5: Model podwójnego opłaszczenia.** Schemat przedstawia mechanizm opuszczania jądra przez kapsydy wirusowe poprzez nabycie osłonki pierwotnej, będącej pochodną wewnętrznej błony jądrowej. Pierwotnie opłaszczone kapsydy przedostają się do przestrzeni perinuklearnej. Następnie dochodzi do fuzji osłonki pierwotnej z zewnętrzną błoną jądrową oraz uwolnienia „nagich” kapsydów do cytoplazmy. W kolejnych etapach dochodzi do nabycia białek tegumentu i osłonki ostatecznej, pochodzącej z sieci trans-Golgi. TGN – sieć trans-Golgi; PPN – przestrzeń perinuklearna.

Jednym z dowodów na poparcie powyższej hipotezy jest fakt, iż w wielu badaniach zaobserwowano pierwotnie opłaszczone kapsydy w przestrzeni perinuklearnej [61], [70], [73], [74]. Kolejnym dowodem na zasadność tego modelu jest inna kompozycja białkowa oraz morfologia pierwotnie opłaszczonych wirionów w porównaniu do dojrzałych. W dojrzałych wirionach nieobecne są białka UL31 oraz UL34, kapsydy otoczone są grubą warstwą tegumentu, a w osłonce zakotwiczone są glikoproteiny [70], [74]. Natomiast w wirionach otoczonych osłonką pierwotną brakuje wielu białek tegumentu [75]–[78], warstwa tegumentu jest znacznie cieńsza, a osłonka pozbawiona jest glikoprotein [75], [78].

Ucieczka kapsydów z jądra na drodze rozkładu błony jądrowej jest typowa dla adenowirusów [79], parwowirusów [80] oraz poliomawirusów [81]. W przypadku alfaherpeswirusów, została zaobserwowana jedynie dla infekcji mutantem wirusa PRV, nie posiadającym genów kodujących białka UL31 oraz UL34 (głównych efektorów w modelu podwójnego opłaszczenia) [82], [83] oraz przy hodowli wirusa HSV-1 w komórkach nieposiadających komórkowej ATPazy TorA (z ang. *torsin A*) [84].

Model pojedynczego opłaszczenia w cytoplazmie polega na opuszczeniu jądra przez kapsydy przez powiększone pory jądrowe [85], [86]. Stosując skaningową i transmisyjną mikroskopię elektronową, zaobserwowano powiększenie średnicy porów jądrowych do ok. 100 nm w komórkach Vero oraz HeLa, infekowanych wirusem HSV-1 [86]. Wyniki analizy przyżyciowej [87] oraz dane pozyskane z immunofluorescencji [88] nie potwierdzają tej hipotezy. Nie jest wykluczone, że pory jądrowe mogą ulegać powiększeniu w odpowiednich warunkach eksperymentalnych, jednak tego typu droga opuszczenia jądra przez kapsydy wydaje się dość nietypowa.

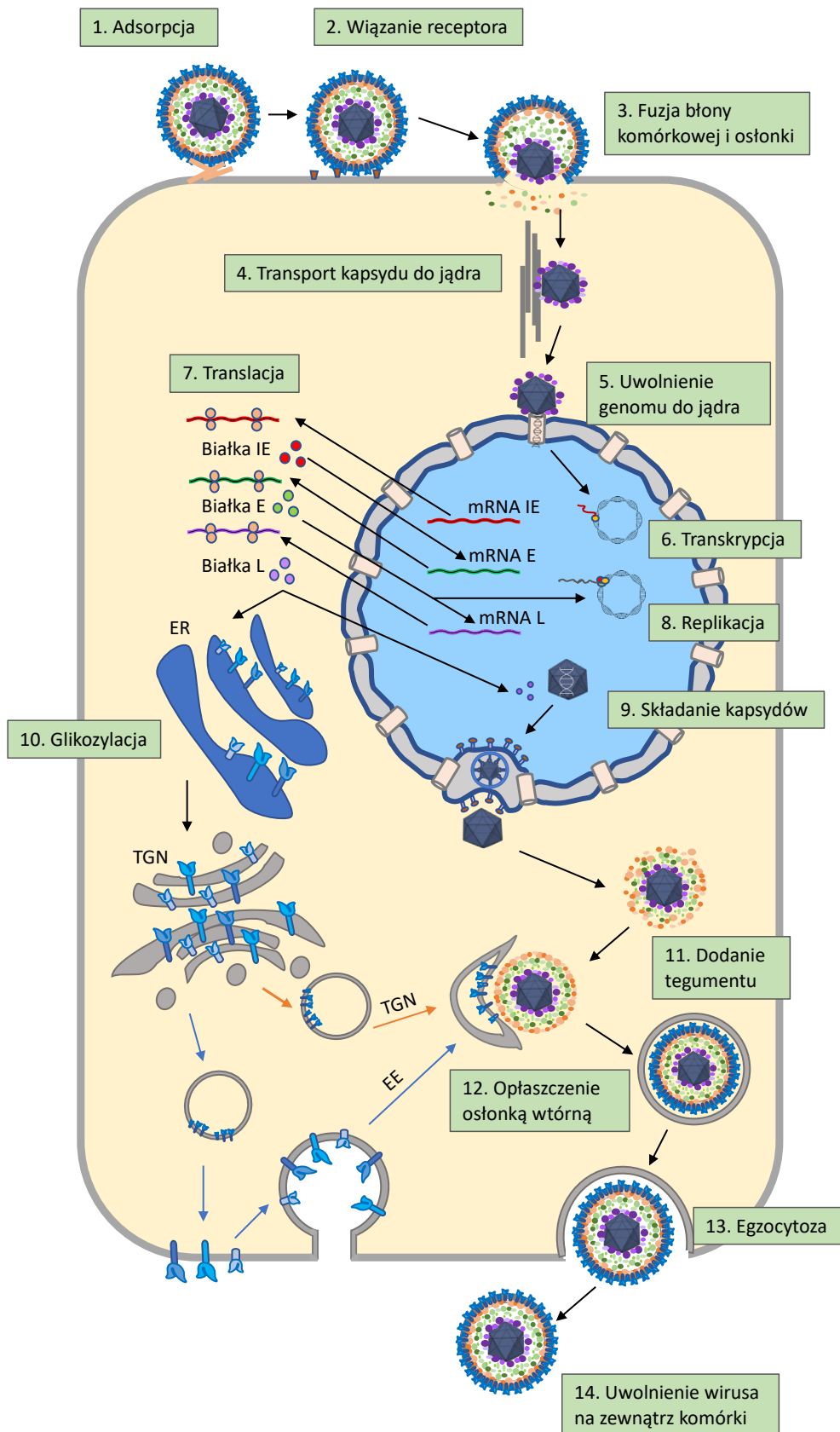
Model rozkładu błony jądrowej oraz pojedynczego opłaszczenia obecnie rozpatrywane są jako drogi alternatywne, w przypadku niedostępności preferowanego przez alfaherpeswirusy modelu podwójnego opłaszczenia [64].

W kolejnym etapie cyklu replikacyjnego, alfaherpeswirusy nabywają tegument oraz osłonkę ostateczną. Jest to złożony proces bazujący na sieci skomplikowanych interakcji między białkami kolejnych warstw tegumentu oraz oddziaływaniami białek tegumentu z błonami i białkami osłonki wirusowej [35]. Najpierw dodawany jest tegument wewnętrzny, zawierający białka oddziałujące bezpośrednio z kapsydem – UL36 oraz UL37 [89]–[91]. Obecnie wciąż niewyjaśnione pozostaje, czy wspomniane białka dodawane są w jądrze komórkowym czy w cytozolu [91]. N-koniec białka UL36 wiąże UL37 oraz białko zewnętrznego tegumentu – VP16 (UL48), łącząc kapsyd z resztą białek tegumentu [92], [93]. VP16 oddziałuje z białkami środkowego tegumentu – VP11/12 (UL46), VP13/14 (UL47) oraz VP22 (UL49) [90], [93]–[95]. VP22 pełni bardzo ważną rolę w sieci oddziaływań białek tegumentu oraz w interakcji tegumentu z błonami. Oddziałuje ono z białkiem zewnętrznego tegumentu – UL16 [96], [97], z wirusowymi białkami błonowymi – gE, gM oraz gD [96], [98], [99], jak również bezpośrednio z błoną za pośrednictwem fosfolipidów komórkowych [100]. Innymi ważnymi białkami w procesie nabycia osłonki wtórnej są konserwowane białka zewnętrznego tegumentu – UL51, UL7 oraz UL14 [101]–[106]. Białko UL51 oraz inne białko zewnętrznego tegumentu - UL11 są acylowane, co umożliwia im bezpośrednią interakcję z błoną komórkową [107]–[109]. Oddziałują one także z glikoproteiną gE [99], [110]–[112].

W procesie nabycia osłonki wtórnej może również brać udział białko kapsydowe – UL37, które wykazuje pewną homologię strukturalną do białek

komórkowych regulujących proces wewnątrzkomórkowego transportu do błon [113]. Oddziałuje ono również z kompleksem gK/UL20 [114].

Przed wytworzeniem sieci interakcji z białkami tegumentu, glikoproteiny transportowane są z retikulum endoplazmatycznego do sieci trans aparatu Golgiego, gdzie ulegają glikozylacji [115]. Następnie transportowane są one na powierzchnię komórki, po czym ulegają endocytozie [116]. Nabycie osłonki wtórnej zachodzi w sieci trans-Golgi [117] lub za pośrednictwem wczesnych endosomów [118]. Kapsyd wraz z tegumentem zostaje opłaszczony osłonką wtórną, przy udziale niezbędnego dla transportu białkowego kompleksu sortującego endosomy (z ang. *endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT) [119]–[121]. W końcowym etapie, w pełni opłaszczone wiriony transportowane są w pęcherzykach na powierzchnię komórki i uwalniane na drodze egzocytozy [72] **(Ryc. 6)**.



**Ryc. 6: Podsumowanie cyklu litycznego alfaherpeswirusów.** W ramkach oznaczono kolejne etapy infekcji litycznej. Na schemacie zilustrowano dwie drogi nabywania osłonki ostatecznej – z sieci trans-Golgi (pomarańczowe strzałki) oraz z wczesnych endosomów (niebieskie strzałki). EE – wczesne endosomy; ER – retikulum śródplazmatyczne; TGN – sieć trans-Golgi.

## Latencja

Stan latencji alfaherpeswirusów zachodzi w neuronach czuciowych ośrodkowego układu nerwowego. Po infekcji produktywnej w komórkach nabłonka, wiriony potomne przedostają się do aksonów nerwów czuciowych, a następnie przy pomocy mikrotubuli, transportowane są do ciała komórki. Jest to tzw. transport aksoplazmatyczny wsteczny (z ang. *retrograde transport*), który zachodzi dzięki oddziaływaniu białek wewnętrznego tegumentu z dyneiną [122]. Gdy genom zostanie uwolniony do jądra komórki nerwowej, zostaje aktywowany tryb infekcji latentnej. Genom ulega cyrkularyzacji oraz związaniu przez białka histonowe, które wyciszają ekspresję wszystkich genów alfaherpeswirusowych poza transkryptem związanym z latencją (z ang. *latency-associated transcript*, LAT) [123]–[125]. Transkrypt LAT jest jedynym mRNA wirusowym produkowanym w dużej ilości w trakcie fazy latentnej infekcji. Jego ekspresja jest silnie hamowana w trakcie infekcji produktywnej przez wiązanie białka ICP4 [126]. Częsteczką mRNA LAT podlega procesowi „splicing”, na skutek którego powstają stabilne introny, częściowo komplementarne do mRNA transaktywatora genów litycznych - ICP0 [127]–[129]. Dojrzały transkrypt LAT jest również przekształcany przez maszynę komórki do miRNA lub innych małych cząsteczek RNA, które mogą epigenetycznie wpływać na hamowanie ekspresji genów cyklu litycznego [129]. Rola oraz dokładny mechanizm działania transkryptu LAT oraz jego pochodnych nie została do tej pory dokładnie poznana [130]. Wiadomo jednak, że mutanty wirusowe nieprodukujące LAT przechodzą w stan latencji znacznie mniej efektywnie niż typ dziki wirusa [131], [132].

Pod wpływem różnego rodzaju czynników stresowych, wirus może ulec reaktywacji ze stanu latencji [133]–[135]. Po aktywacji ścieżki stresowej w komórce gospodarza, dochodzi do transkrypcji genów wirusowych, replikacji genomu oraz składania wirionów. Następnie wiriony transportowane są z ciała komórki nerwowej do aksonów, na drodze tzw. transportu aksoplazmatycznego postępującego (z ang. *anterograde transport*). Z aksonów wiriony przedostają się do miejsca infekcji pierwotnej, co umożliwia dalsze rozprzestrzenianie wirusa na innych gospodarzy [136].

## 4.2 Rozprzestrzenianie się wirusów na drodze bezpośredniego transportu międzykomórkowego (*cell-to-cell spread*)

Kluczowym etapem w cyklu replikacyjnym każdego wirusa jest uwolnienie wirionów potomnych i zainfekowanie kolejnych komórek. Wirusy mogą opuszczać zainfekowaną komórkę na kilka sposobów: (I) poprzez lizę komórki, charakterystyczną dla np. adenowirusów, reowirusów, rotawirusów czy pikornawirusów [137]–[139]; (II) poprzez pączkowanie bezpośrednio z błony komórkowej, nabywając tym samym osłonkę, jak w przypadku wirusa HIV, grypy, paramyksowirusów oraz pneumowirusów [140]–[142]; (III) na drodze egzocytozy, charakterystycznej dla herpeswirusów, flawiwirusów oraz koronawirusów [72], [143]. Wiele wirusów wykształciło więcej niż jeden mechanizm, pozwalający na efektywne rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza. Najlepiej opisanym mechanizmem zakażenia jest wnikanie wirusów do komórek od zewnątrz, ze środowiska zewnątrzkomórkowego (z ang. *cell-free entry*, zwane dalej CFE).

CFE jest typową drogą infekcji dla wszystkich wirusów, niezależnie od obecności lub braku osłonki. Jest to także droga kluczowa do rozprzestrzeniania się wirusów pomiędzy oddalonymi od siebie komórkami oraz do infekcji kolejnych gospodarzy [143], [144]. Podstawową wadą CFE jest „narażenie” cząstek wirusowych na bariery fizykochemiczne, kinetyczne oraz immunologiczne. Wirusy przemieszczające się za pośrednictwem CFE potrzebują czasu na penetrację błony śluzowej, odnalezienie komórki docelowej oraz związanie odpowiedniego receptora (lub receptorów), co przekłada się na utratę infekcyjności oraz wyeksponowanie na odpowiedź komórkową i humoralną układu immunologicznego gospodarza [144].

Aby przezwyciężyć powyżej opisane bariery, wirusy rozwinęły alternatywną drogę rozprzestrzeniania się – bezpośredni transport międzykomórkowy (z ang. *cell-to-cell spread*, zwany dalej CTC). Wirusy wykorzystujące CTC, są w stanie infekować komórki sąsiadujące z zainfekowanymi, bez wydostawania się do środowiska zewnątrzkomórkowego, co czyni tę drogę infekcji znacznie szybszą niż CFE [145]–[149]. Transmisja wirusów na drodze CTC może również zachodzić przez wiązanie specyficznych receptorów, które są specjalnie rekrutowane do konkretnego miejsca połączeń komórkowych, co przekłada się na większą wydajność tej drogi infekcji [147], [150], [151]. Kolejną zaletą, świadczącą o szybkości CTC, jest możliwość transmisji niekompletnych

wirionów, np. „nagich” kapsydów wirusowych lub innych elementów strukturalnych wirusów, tj. przykładowo genomu wirusa odry w formie rybonukleoproteiny [152]–[154].

By przedostać się do kolejnych komórek, wirusy mogą m.in. doprowadzić do miejscowej fuzji błon komórki zainfekowanej z komórkami sąsiadującymi, używać już istniejących połączeń komórkowych (np. połączenia przylegające [155], synapsy nerwowe [156]) lub indukować powstawanie nowych struktur łączących komórki (np. międzykomórkowe nanorurki [157]). Wszystkie wymienione struktury umożliwiają rozprzestrzenianie się wirusów w środowisku zawierającym przeciwciała neutralizujące [158]–[172].

Transmisja na drodze CTC łączy się nierozzerwalnie z patogenezą HSV-1, ponieważ jest to główna droga infekcji komórek nabłonkowych oraz nerwowych. Jak już wspomniano w **podrozdziale 4.1.3**, to właśnie w komórkach nerwowych wirus przechodzi w stan latencji, z którego może się reaktywować, co przekłada się na nieuleczalność opryszczki pospolitej [155], [173]. Rozprzestrzenianie się wirusów za pośrednictwem CTC przyczynia się również do chronicznej infekcji wątroby przez wirusa zapalenia wątroby typu C (z ang. *hepatitis C virus*, HCV) i oporności na leki antywirusowe [174]–[177]. Podobnie dla wirusa HIV, zaobserwowano, że dzięki różnym mechanizmom CTC, w organizmie powstają rezerwuary wirusa [178], co także łączy się z niepowodzeniem terapii [179], [180].

#### **4.2.1 Mechanizmy bezpośredniego transportu międzykomórkowego**

W najnowszej literaturze opisano dziewięć mechanizmów CTC, charakterystycznych dla wirusów zwierzęcych [143], [144] (**Ryc. 7**):

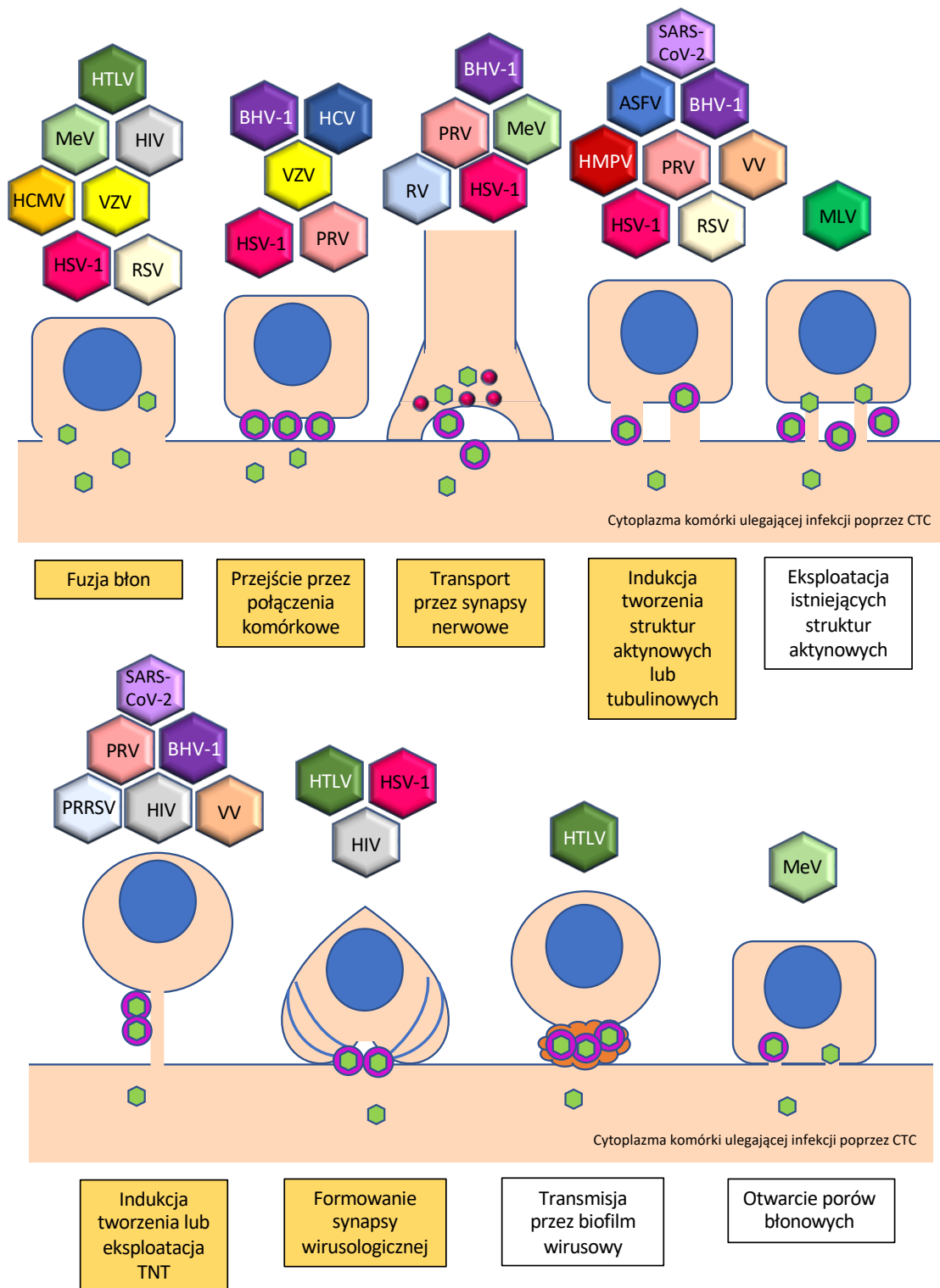
1. Fuzja błon komórki zainfekowanej z komórkami sąsiadującymi. Tego rodzaju CTC może wiązać się z formowaniem syncytium lub ograniczać się do miejscowej fuzji, zachowując strukturalną autonomię komórek. Jest to charakterystyczny mechanizm dla herpeswirusów [181]–[183], paramyksowirusów [184]–[186] oraz retrowirusów [187], [188].
2. Przejście przez połączenia komórkowe. W tym typie CTC, białka wirusowe oddziałują z białkami komórki niezainfekowanej w obrębie połączeń komórkowych,

- doprowadzając do transmisji wirusa. Mechanizm ten został opisany dla herpeswirusów [189], [190] i HCV [163], [191].
3. Transport przez synapsy nerwowe. Dojrzałe wiriony lub „nagie” kapsydy przedostają się z zainfekowanego neuronu do przestrzeni synaptycznej, a następnie ulegają fuzji lub endocytozie do niezainfekowanej komórki nerwowej w obrębie tej samej synapsy. Ta droga CTC została opisana dla rabdowirusów [156], [192], herpeswirusów [193], [194] oraz paramyksowirusów [195].
  4. Indukcja tworzenia struktur aktynowych i/lub tubulinowych łączących komórki. Pokswirusy indukują powstanie wypustek, zwanych ogonami aktynowymi (z ang. *actin tails*), „wyrastających” z komórki zainfekowanej w kierunku komórek niezainfekowanych. Herpeswirusy doprowadzają do powstania struktur zawierających aktynę i tubulinę, przenoszących wirusa do komórek sąsiadujących [159], [196], [197]. Asfarwirusy [198], pneumowirusy [166], paramyksowirusy [199] oraz koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego 2 (z ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) indukują powstanie filopodiów łączących komórki zainfekowane z niezainfekowanymi [200].
  5. Eksploatacja istniejących struktur aktynowych łączących komórki. W tym typie CTC, wirusy wykorzystują już istniejące filopodia do infekcji komórek sąsiadujących. Ten mechanizm charakterystyczny jest dla retrowirusów [150].
  6. Indukcja tworzenia lub eksploatacja międzykomórkowych nanorurek (ang. *tunneling nanotubes*, TNT). Retrowirusy wykorzystują istniejące TNT do szybkiego rozprzestrzeniania się między limfocytami T oraz indukują powstanie TNT w makrofagach [157]. Do indukcji TNT w zainfekowanych komórkach doprowadzają również herpeswirusy [172], [201], wirus grypy, wirus zespołu rozrodzo-oddechowego świń (z ang. *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV) [171], wirus krowianki (z ang. *vaccinia virus*, VV) [202] oraz SARS-CoV-2 [203].
  7. Formowanie synapsy wirusologicznej. Retrowirusy doprowadzają do polaryzacji zainfekowanych limfocytów, tworzenia miejsc kontaktu i wydzielania cząstek wirusowych w kierunku receptorów niezainfekowanych komórek [204]–[206]. Mechanizm przypominający formowanie synapsy wirusologicznej został opisany również dla HSV-1 w infekcji limfocytów T [207].



8. Transmisja za pośrednictwem biofilmu wirusowego. Wiriony wirusa ludzkiej białaczki z komórek T (z ang. *human T-cell leukemia/lymphoma virus*, HTLV-1) tworzą bogate w węglowodany, kolagen i proteoglikany klastry na powierzchni zainfekowanych limfocytów T. Do transportu wirionów dochodzi w miejscu kontaktu klastra z komórką niezainfekowaną [208].
9. Otwarcie porów błonowych. W infekcji wirusem odry (z ang. *measles virus*, MeV) dochodzi do uwolnienia zawartości cytoplazmy komórki zainfekowanej do komórki sąsiadującej poprzez otwarte pory błonowe [153].

Rozprzestrzenianie się wirusów na wyżej opisanych typach CTC zostało do tej pory udowodnione wyłącznie dla wirusów osłonkowych [144]. Jediną drogą infekcji, inną niż CFE, zidentyfikowaną dla wirusów pozbawionych osłonki jest transmisja za pośrednictwem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W tym typie rozprzestrzeniania się cząstki wirusowe transportowane są w pęcherzykach do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, z której dostają się do niezainfekowanych komórek. Opłaszczenie błonami autofagosomalnymi lub egzosomalnymi daje cząstkom wirusowym częściową ochronę przed przeciwciałami neutralizującymi. Ten mechanizm został opisany dla enterowirusów [209], w tym wirusa polio [210], rotawirusów [211], norowirusa [211], wirusa zapalenia wątroby typu A (z ang. *hepatitis A virus*, HAV) [212] oraz osłonkowego HCV [213].



**Ryc. 7: Mechanizmy CTC.** W żółtych prostokątach oznaczono drogi CTC charakterystyczne dla alfaherpeswirusów. W sześciokątach oznaczono przykładowe wirusy rozprzestrzeniające się danym typem CTC. Małe, zielone sześciokąty oznaczają „nagie” kapsydy wirusowe, zielone sześciokąty w fioletowych okręgach – cząstki wirusowe opłaszczone osłonką, różowe koła – pęcherzyki synaptyczne. Rozwinięcie nazw skrótowych wirusów znajduje się w wykazie skrótów.

#### 4.2.2 Cell-to-cell spread alfaherpeswirusów

Jedna z najwcześniejszych definicji *cell-to-cell spread* odnosiła się do niezakłóconego rozprzestrzeniania się alfaherpeswirusów w środowisku przeciwciał neutralizujących [160]. Dla tej podrodziny opisano sześć z dziewięciu znanych mechanizmów CTC (**Ryc. 7**). Najważniejszą rolę w tym typie transmisji pełnią glikoproteiny ostonkowe wirusów. Odpowiedzialne za wejście do komórki - gB, gD, gH/gL zaangażowane są w fuzję błon komórki zainfekowanej z sąsiadującą. Współpraca powyższych glikoprotein z kompleksem gE/gI jest kluczowa do rozprzestrzeniania się przez synapsy nerwowe. Kompleks gE/gI jest odpowiedzialny również za rozprzestrzenianie się alfaherpeswirusów przez połączenia komórkowe. Poza glikoproteinami, wielofunkcyjna kinaza US3 pełni ważną rolę w indukcji tworzenia struktur bogatych w aktynę i tubulinę oraz TNT. W **tabeli 2** zestawiono typy CTC charakterystyczne dla przykładowych alfaherpeswirusów wraz z białkami wirusowymi zaangażowanymi w dany rodzaj transmisji.

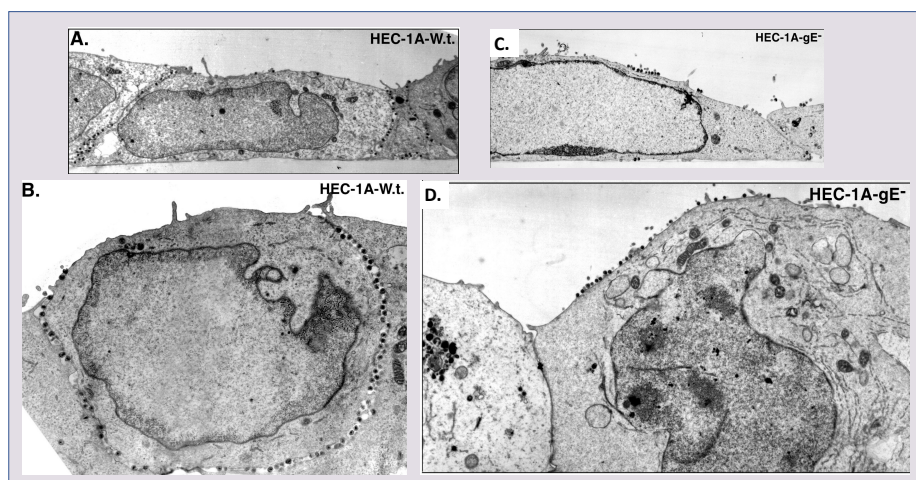
**Tab. 2:** *Cell-to-cell spread* przykładowych alfaherpeswirusów.

Wirus	Białka CTC	Typy CTC
HSV-1	gB, gD, gH, gL, gE/gI, US3, US9	Fuzja błon [214] ; Przejście przez połączenia komórkowe [155], [215], [216]; Przejście przez synapsy nerwowe [217]; Indukcja tworzenia struktur aktynowych [218]; Formowanie synapsy wirusologicznej [207].
VZV	gB, gH, gL, gE	Fuzja błon [183], [219] ; Przejście przez połączenia komórkowe [220]; Przejście przez synapsy nerwowe [221].
PRV	gB, gL, gH, gE/gI, US3, US9	Fuzja błon [222]; Przejście przez połączenia komórkowe [223]; Przejście przez synapsy nerwowe [224]; Indukcja tworzenia struktur aktynowych [159]; Indukcja tworzenia TNT [168].
BHV-1	gB, gD, gG, gH, gL, gE/gI, US3, US9	Przejście przez połączenia komórkowe [225]–[227]; Przejście przez synapsy nerwowe [228]; Indukcja tworzenia struktur aktynowych [197]; Indukcja tworzenia TNT [172].

## Przejście przez połączenia komórkowe

Połączenia komórkowe złożone są z białek przezbłonowych różnego typu, których główną funkcją jest zachowanie integralności tkanki oraz uszczelnienie miejsc kontaktu komórek nabłonkowych, ograniczając wymianę substancji drobnocząsteczkowych. Istnieją trzy typy takich połączeń: połączenia ścisłe, inaczej zamykające (z ang. *tight junctions*, TJ), połączenia przylegające (z ang. *adherent junctions*) oraz desmosomy. Połączenia ścisłe stanowią granicę pomiędzy stroną wierzchołkową (inaczej apikalną) oraz podstawno-boczną (inaczej bazo-lateralną) komórek nabłonka [144]. Jest to tzw. polaryzacja błony komórkowej, która umożliwia sortowanie komponentów komórkowych, w zależności od specyficznego sygnału, na konkretną jej stronę.

Herpeswirusy są jedną z najlepiej poznanych rodzin wirusów wykorzystujących połączenia komórkowe do infekcji na drodze CTC [189], [190]. Zostało udowodnione, że cząstki wirusowe są preferencyjnie sortowane na powierzchnię podstawno-boczną błony, w miejsca połączeń komórkowych (**Ryc. 8**). Kluczową rolę w tym procesie pełni kompleks glikoprotein gE/gI, a konkretnie domena cytozolowa gE [99], [155], [215]. Mutanty posiadające delecje genów kodujących gE/gI formują znacznie mniejsze łyśinki wirusowe w porównaniu do typu dzikiego wirusa w hodowlach *in vitro* [155], [220], [223], [225], jak również powodują mniejsze uszkodzenia nabłonka rogówki królików i myszy [155]. Barwienie immunofluorescencyjne wykazało, iż kompleks gE/gI kolokalizował ze znajdującą się w połączeniach przylegających  $\beta$ -kateniną. Nie wykazano natomiast kolokalizacji z komponentami połączeń ścisłych (np. białkiem ZO-1) [215].

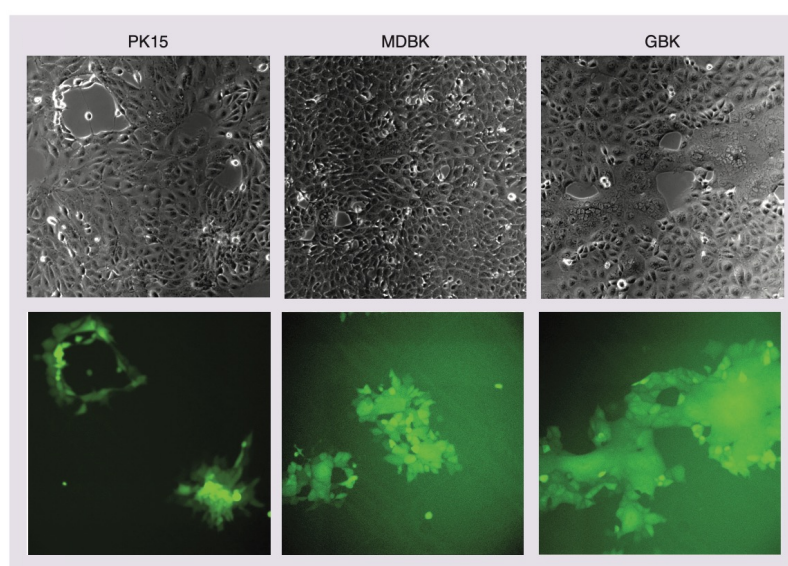


**Ryc. 8: Rola białka gE w sortowaniu wirionów HSV-1 do połączeń komórkowych w spolaryzowanych komórkach linii HEC-1A.** (A. i B.) Wiriony HSV-1 WT zlokalizowane w obrębie połączeń komórkowych i na powierzchni podstawnej komórek; (C. i D.) Wiriony pozbawionego gE rekombinanta HSV-1 (gE<sup>-</sup>) zlokalizowane w większości na powierzchni wierzchołkowej komórek. Obrazowanie w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wykonano po 16-18 hpi. Zaadaptowano z Johnson i wsp. 2001 [229].

### Fuzja błon

Rozprzestrzenianie się wirusów na drodze fuzji błon zachodzi zwykle wtedy, gdy białka odpowiedzialne za wnikanie wirusów do komórki znajdują się w miejscu kontaktu komórki zainfekowanej z komórkami sąsiadującymi, np. na powierzchni podstawno-bocznej komórek nabłonkowych. Fuzja błon może skutkować formowaniem syncytiumów. W obrębie syncytium znajduje się zwykle wiele jąder komórkowych i dochodzi do całkowitego połączenia cytoplazmy komórek. Umożliwia to szybkie postępowanie infekcji i eliminuje etap składania wirionów potomnych, tj. opłaszczania osłonką ostateczną. Herpeswirusy mogą indukować powstawanie syncytiumów zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. W przypadku wirusa HSV-1, CTC na drodze fuzji błon wymaga skoordynowanej współpracy glikoprotein gB, gD, kompleksu gH/gL oraz interakcji gD z nektyną 1 na powierzchni komórki sąsiadującej [181], [230], [231]. Formowanie syncytium przez izolaty kliniczne HSV-1 w hodowlach *in vitro* jest bardzo rzadko obserwowane i przypisuje się je raczej adaptacji wirusa do namnażania w konkretnej linii komórkowej [144]. W przeciwieństwie do HSV-1, wszystkie izolaty kliniczne wirusa VZV formują syncytium w hodowlach komórkowych [183]. Fuzja błon w przypadku infekcji VZV, zachodzi albo za pośrednictwem kompleksu gH/gL albo gE i gB [183], [219]. Powstanie syncytium jest zależne od typu komórek, w których namnaża się konkretny wirus. Przykładowo, wirus

PRV indukuje formowanie syncytiów w komórkach bydlęcych, ale nie tworzy ich w komórkach nabłonkowych nerki świni (PK15) (**Ryc. 9**) [232].



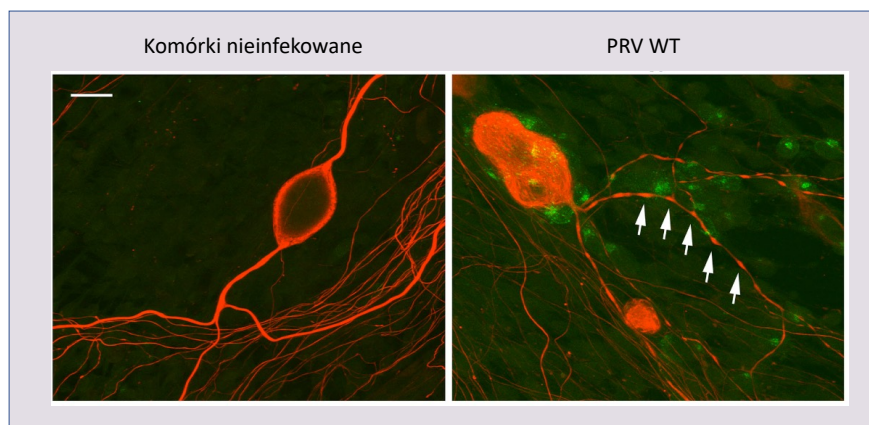
**Ryc. 9: Formowanie syncytiów przez wirusa PRV.** W komórkach PK15, wirus PRV tworzy łysinki. W komórkach MDBK oraz GBK indukuje powstawanie syncytiów komórek zainfekowanych. Komórki zostały zainfekowane fluorescencyjnym mutantem PRV, obrazowanie w mikroskopie fluorescencyjnym wykonano 24 hpi. GBK – z ang. *Georgia Bovine Kidney*, MDBK – z ang. *Madin-Darby Bovine Kidney*, PK15 – z ang. *Porcine Kidney-15*. Zaadaptowano z: Ambrosini i Enquist, 2015 [232].

### Przejście przez synapsy nerwowe

Jak już opisano w **podrozdziale 4.1.3**, herpeswirusy są zdolne do infekcji nerwów czuciowych, by ustanowić w nich stan latencji. Ważnymi białkami dla neurotropizmu herpeswirusów są gB, kompleks glikoprotein gE/gI oraz gD. Pomimo mnogości publikacji naukowych, wciąż istnieją pewne kontrowersje dotyczące formy wirionów potomnych transportowanych wzdłuż aksonów komórek nerwowych [233]. Jedną z teorii mówi, iż wzdłuż aksonów transportowane są dojrzałe cząstki wirusowe zamknięte w pęcherzykach komórkowych (tzw. z ang. *married model*). Druga teoria zakłada, że kapsydy wirusowe transportowane są niezależnie od glikoprotein osłonkowych, a do ich opłaszczania osłonką dochodzi w obrębie synapsy nerwowej (tzw. z ang. *separate model*). Obecnie większość naukowców przychyliła się do teorii „*married model*”. Niezależnie od miejsca składania wirionów potomnych w neuronach, alfaherpeswirusy są sortowane do zakończeń aksonów, po czym rozprzestrzeniają się z komórki presynaptycznej do postsynaptycznej w obrębie synapsy nerwowej [136], [234]–[237]. Proces sortowania

wirionów potomnych nie został dokładnie poznany, jednak wiadomo, iż kluczową rolę w nim pełni kompleks gE/gI oraz US9 [238]–[245].

Rozprzestrzenianie się herpeswirusów może także zachodzić poprzez zgrubienia aksonu (z ang. *varicosities*) bezpośrednio do komórek sąsiadujących (**Ryc. 10**), zarówno nerwowych, jaki i innego typu [246], [247]. Indukcja formowania zgrubień aksonów została opisana w infekcji wirusem PRV oraz HSV-1 [248]. Za kluczowe w tym procesie uważa się oddziaływanie glikoproteiny gD z nektyną 1 [247].

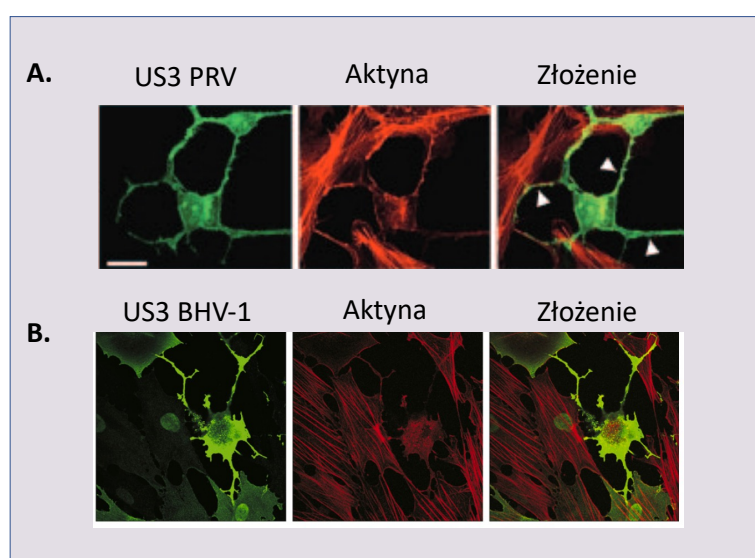


**Ryc. 10:** Indukcja tworzenia zgrubień aksonów (z ang. *varicosities*) w komórkach nerwu trójdzielnego świni, zainfekowanych PRV. Barwione immunofluorescencyjnie preparaty obrazowano we fluorescencyjnym mikroskopie konfoklanym po 24 hpi. Czerwony: neurofilamenty; zielony: PRV. Białymi strzałkami oznaczono zgrubienia aksonu. Skala: 20  $\mu$ m. Zaadaptowano z: De Regge i wsp. 2006 [247].

#### Indukcja tworzenia struktur aktynowych

Wirusy HSV-1, PRV oraz BHV-1 modyfikują cytoszkielet, co skutkuje formowaniem długich, zawierających aktyne połączeń komórkowych, zwanych wypustkami (z ang. *protrusions*) [159], [196], [197], [218]. Wypustki łączą komórki zainfekowane z sąsiadującymi, umożliwiając szybkie rozprzestrzenianie się wirusa w środowisku przeciwciał neutralizujących. W przypadku PRV oraz BHV-1 kluczową rolę w tym procesie pełni kinaza US3 [159], [197] (**Ryc. 11**). Do rearanżacji cytoszkieletu dochodzi zarówno w komórkach infekowanych, transfekowanych plazmidem kodującym gen *us3* oraz transdukowanych rekombinowanym bakulowirusem kodującym gen tej kinazy. Punktowa mutacja w centrum katalitycznym US3 (K282A) całkowicie hamuje formowanie wypustek w komórkach transdukowanych rekombinowanym bakulowirusem [197].

Poza formowaniem wypustek, wirus HSV-1 indukuje również tworzenie filopodiów [249]. Filopodia są to wystające na zewnątrz komórek, cytoplazmatyczne struktury, o średnicy ok. 0,1 do 0,3  $\mu\text{m}$ . Wypełniają je równoległe ułożone wiązki F-aktyny [250]. Filopodia zaangażowane są w migrację komórek, proces gojenia, adhezję do macierzy zewnątrzkomórkowej oraz CTC [250], [251]. HSV-1, tak jak inne wirusy wykorzystujące tę strukturę komórkową do CTC, przemieszcza się po powierzchni filopodiów – jest to tzw. surfing wirusowy (z ang. *viral surfing*). Indukcja tworzenia nowych filopodiów została opisana dla infekcji komórek nerwowych i zachodzi ona zarówno w obrębie dendrytów, aksonu, jak i ciała komórki [249].



**Ryc. 11: Indukcja tworzenia wypustek w komórkach transfekowanych plazmidem kodującym US3 PRV i transdukowanych rekombinantem bakulowirusowym kodującym US3 BHV-1.** (A) Komórki linii ST zostały transfekowane wektorem zawierającym gen *us3* wirusa PRV pod kontrolą promotora do ekspresji genów w komórkach ssaczyc. Barwione immunofluorescencyjnie preparaty obrazowano we fluorescencyjnym mikroskopie konfoklanym 24 h po transfekcji. Białymi strzałkami oznaczono wypustki komórkowe. Zielony: US3, czerwony: aktyna. Skala: 10  $\mu\text{m}$ . Zadaptowano z Favoreel i wsp. 2005 [159]. (B) Komórki linii KOP zostały transdukowane rekombinantem bakulowirusowym kodującym gen *us3* wirusa BHV-1. Barwione immunofluorescencyjnie preparaty obrazowano we fluorescencyjnym mikroskopie konfoklanym 24 h po transdukcji. Zielony: US3, czerwony: aktyna. Zadaptowano z: Brzozowska i wsp. 2010 [197].

### Indukcja tworzenia TNT

Wykorzystanie międzykomórkowych nanorurek, jako nowej drogi CTC zostało po raz pierwszy opisane przez Rustom i wsp. w 2004 roku [252]. TNT to cienkie, wydłużone struktury wystające z błony komórkowej, które łączą oddalone od siebie komórki, w celu transferu m. in. organelli, jonów, białek oraz miRNA. Średnica TNT to ok. 50 do 200 nm. Na podstawie zawartości oraz średnicy, wyróżniono dwie klasy TNT – cienkie oraz grube



[253]. Cienkie TNT zazwyczaj zbudowane są jedynie z F-aktyny (nie zawierają mikrotubuli), a ich średnica nie przekracza 0,7  $\mu\text{m}$ . Natomiast grube TNT zawierają zarówno mikrotubule jak i filamenty F-aktynowe oraz mają średnicę powyżej 0,7  $\mu\text{m}$ . Organelle takie jak mitochondria, lizosomy czy peroksosomy zostały zaobserwowane jedynie w grubych TNT [143]. Obydwa typy TNT mogą zawierać białka motoryczne – miozynę Va i/lub miozynę X [252], [254]. Sugeruje się, iż funkcją miozyny Va jest transport pęcherzyków endocytarnych w TNT [252], podczas gdy miozyna X zaangażowana jest w proces formowania TNT [255]. Poza miozyną, grube TNT mogą ponadto zawierać kinezyne -1 oraz dyneinę [253], [256]. W odróżnieniu od filopodiów, TNT mogą mieć otwarte końce, tworząc tunel pomiędzy połączonymi przez nie komórkami, nie przylegają do podłoża oraz są dłuższe – do 150  $\mu\text{m}$  [257].

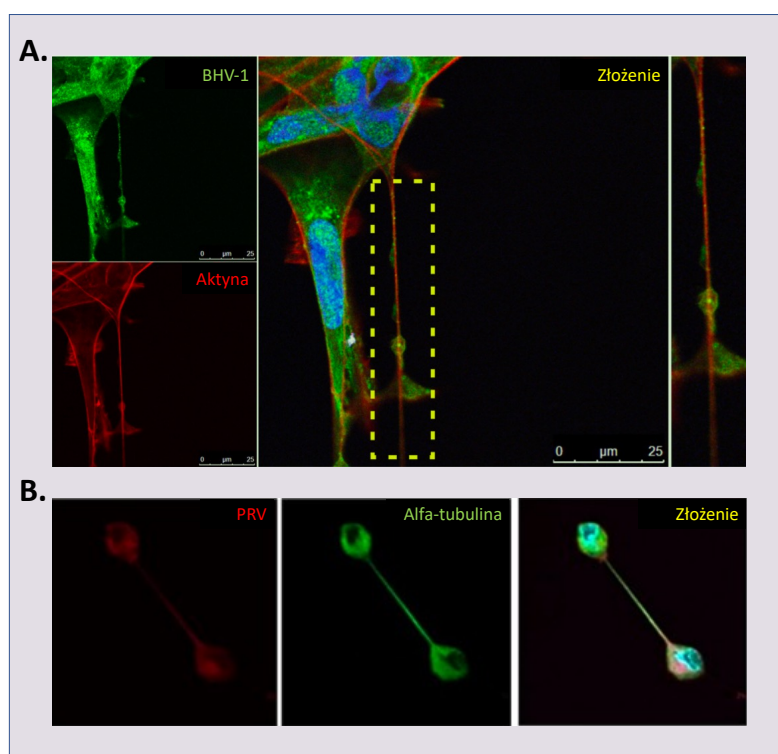
Obecnie istnieją dwa, niewykluczające się modele mechanizmu formowania TNT. Pierwszy model zakłada, że TNT są pochodną struktur przypominających filopodia, które ulegają wydłużeniu i przyłączeniu do komórki sąsiadującej, po czym dochodzi do różnicowania ich w TNT [252]. Natomiast w drugim modelu, TNT są pochodną połączenia dwóch komórek, które oddaliły się od siebie, pozostawiając cienką „nitkę”, wydłużaną wraz z ruchem komórek [157], [258].

Komórki formują TNT zarówno w warunkach fizjologicznych jak i pod wpływem czynników stresowych, tj. m. in. stres oksydacyjny, głodzenie, hiperglikemia, stan zapalny, naświetlanie UV, niskie pH czy hipoksja [259]–[262]. Sugeruje to, że w specyficznych warunkach, formowanie TNT może być częścią mechanizmu odpowiedzi na stres, w której dochodzi do wymiany cząsteczek oraz transferu energii pomiędzy uszkodzonymi a zdrowymi komórkami [201].

Indukcja formowania TNT lub struktur TNT-podobnych została opisana dla alfaherpeswirusów PRV [159], [168], [263], BHV-1 [172], [197], HSV-1 [218], HSV-2 [264] oraz BHV-5 [265]. Za struktury TNT-podobne, Jansens i wsp. uznają opisane wcześniej w tym podrozdziale wypustki [168], [201]. W komórkach infekowanych wirusem PRV oraz BHV-1, TNT zawierały dojrzałe cząstki wirusowe, poruszające się w kierunku komórek niezainfekowanych, w obecności przeciwciał neutralizujących [168], [172]. Wg Jansens i wsp., TNT formowane przez PRV są strukturami zamkniętymi oraz bardzo stabilnymi, co

tłumaczone jest obecnością mikrotubuli oraz  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny w miejscu kontaktu TNT z komórką docelową [168]. Dojrzałe wiriony PRV transportowane są w pęcherzykach wewnątrz TNT i uwalniane na drodze egzocytozy do komórek akceptorowych [168]. W przypadku wirusa BHV-1, TNT są strukturami otwartymi, stanowiącymi tunel pomiędzy łączącymi je komórkami [172]. Ponadto charakteryzują się one małą stabilnością i wrażliwością na warunki utrwalania chemicznego komórek, co świadczy o przejściowej naturze tych struktur [172]. W przypadku wirusów HSV-1 [218], HSV-2 [264] oraz BHV-5 [265] stwierdzono występowanie jedynie struktur TNT-podobnych.

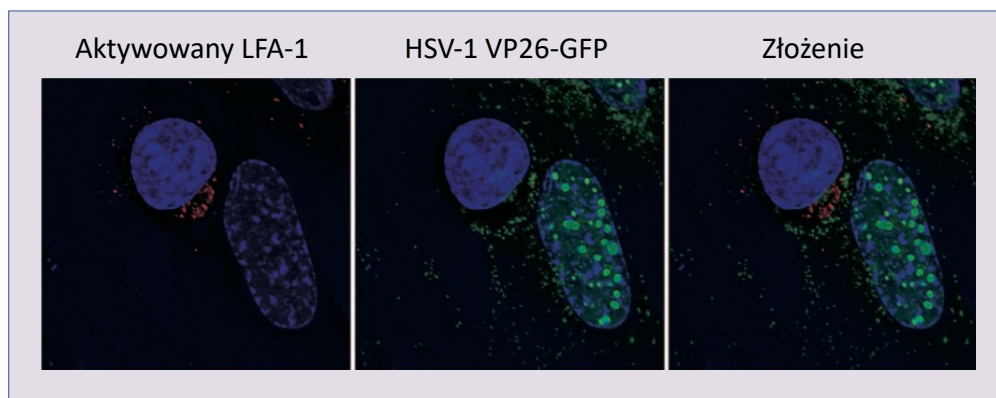
Podobnie jak w przypadku wypustek, przy formowaniu TNT również kluczową rolę pełni kinaza US3. Proces ten nie został jeszcze dokładnie poznany, ale najprawdopodobniej US3 wpływa na kontrolujący dynamikę aktyny szlak sygnalizacji GTPaz Rho poprzez jednoczesną aktywację Cdc42/Rac1 i hamowanie RhoA [263], [266], [267].



**Ryc. 12: Indukcja tworzenia TNT w komórkach zainfekowanych BHV-1 i PRV.** (A.) Komórki linii KOP zostały zainfekowane wirusem BHV-1 WT. Barwione immunofluorescencyjnie preparaty obrazowano we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym po 12 hpi. Zielony: BHV-1, czerwony: F-aktyna, niebieski: jądro komórkowe. Zaadaptowano z: Panasiuk i wsp. 2018 [172]. (B.) Komórki linii ST zainfekowano wirusem PRV WT. Barwione immunofluorescencyjnie preparaty obrazowano we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym po 7 hpi. Czerwony: PRV, zielony:  $\alpha$ -tubulina, cyjan: jądro komórkowe. Zaadaptowano z: Jansens i wsp. 2017 [168].

### Formowanie synapsy wirusologicznej

Synapsa wirusologiczna (z ang. *virological synapse*, VS) jest wyspecjalizowaną strukturą, umożliwiającą rozprzestrzenianie się wirusów limfotropowych na drodze CTC. Pod względem budowy, VS przypomina synapsę immunologiczną. Charakteryzuje się obecnością dużej ilości integryny  $\alpha$ -L oraz jej ligandów [204]. W odróżnieniu od synapsy immunologicznej, w strukturze VS brakuje regionu bogatego w receptor CD3 [268], [269]. Mechanizm przypominający formowanie synapsy wirusologicznej został opisany dla HSV-1 w infekcji limfocytów CD4<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup> bezpośrednio z wcześniej zainfekowanych fibroblastów [207]. W miejscach kontaktu limfocytów z infekowanymi fibroblastami zaobserwowano nagromadzenie LFA-1 (**Ryc.13**). W badaniach Aubert i wsp. dowiedziono, iż taka droga infekcji limfocytów wirusem HSV-1 jest znacznie bardziej efektywna niż CFE. Rozprzestrzenianie się HSV-1 za pośrednictwem VS zachodzi niezależnie od kompleksu gE/gI. Natomiast główną rolę w tym procesie pełni białko gD wraz ze swoimi receptorami komórkowymi [207]. CTC za pośrednictwem VS ulegało zahamowaniu przez przeciwciała skierowane przeciwko LFA-1 lub gD [207].



**Ryc. 13: Transmisja wirusa HSV-1 z fibroblastów do limfocytów za pośrednictwem synapsy wirusologicznej.** Stymulowane fitohemaglutyniną limfocyty inkubowano z fibroblastami infekowanymi mutantem fluorescencyjnym HSV-1 VP26-GFP. W miejscu kontaktu komórek widoczne nagromadzenie aktywowanego LFA-1 (czerwony) oraz kapsydów HSV-1 (zielony). Na niebiesko wyznakowano jądra komórkowe. Obserwacje barwionych immunofluorescencyjnie preparatów przeprowadzono we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym po 1 h inkubacji. Zaadaptowano z: Aubert i wsp. 2009 [207].

## 4.3 Bydlęcy herpeswirus typu 1

### 4.3.1 Choroby i profilaktyka

Bydlęcy herpeswirus typu 1 (BHV-1, Bo-HV-1) infekuje bydło domowe oraz wolno żyjące na całym świecie, przynosząc znaczne straty ekonomiczne w chowie i hodowli zwierząt [270]. Jest to czynnik etiologiczny w dwóch zespołach chorobowych - zakaźnym zapaleniu nosa i tchawicy bydła (z ang. *infectious bovine rhinotracheitis*; IBR) oraz w otręcie bydła (u samic – z ang. *infectious pustular vulvovaginitis*; IPV; u samców - z ang. *infectious pustular balanoposthitis*; IPB). Infekcja BHV-1 jest szczególnie niebezpieczna dla nowonarodzonych cieląt. W takim przypadku może dojść do zakażenia wielonarządowego [271]–[274], prowadzącego do śmierci zwierzęcia w ciągu czterech do pięciu dni [272].

Przebieg zakażenia wirusem BHV-1 w stadzie jest zależny od wielu czynników. Znaczenie ma tutaj przede wszystkim szczep wirusa [275], kondycja układu odpornościowego zwierząt, wiek, płeć [276], [277], zagęszczenie zwierząt w stadzie [278] oraz współistniejące infekcje na tle bakteryjnym. Często pojawiają się także infekcje asymptomatyczne. Brak objawów klinicznych może być związany z infekcją szczepem o obniżonej wirulencji [275] lub odpornością swoistą pochodzącą z przeciwciał mleka matki, pozwalającą na znaczne złagodzenie przebiegu choroby [271], [279].

Zakażenie BHV-1 szerzy się przez kontakt bezpośredni, płciowy lub drogą kropelkową. Do infekcji może dojść również poprzez niewysterylizowane odpowiednio narzędzia i sprzęt wykorzystywane do obsługi zwierząt. Tak jak dla wszystkich alfaherpeswirusów, także dla BHV-1 charakterystyczne jest przejście w stan latencji w nerwach czuciowych [272]. Zwierzęta pozostają nosicielami wirusa i źródłem zakażenia przez całe życie, co powoduje nawroty infekcji w stadach przez wiele lat. Uaktywnieniu się wirusa BHV-1 sprzyjają czynniki stresogenne, tj. transport [280], obniżenie odporności, poród [281], niekorzystne warunki mikroklimatyczne czy zmiana żywienia.

Na podstawie analizy genomowej oraz antygenowej wyróżnia się trzy podtypy bydlęcego herpeswirusa typu 1 - BHV-1.1, BHV-1 1.2a oraz BHV-1.2b [282], [283]. Przez wiele lat przebieg choroby łączony był z infekcją konkretnym podtypem BHV-1. Podtyp 1.1 infekuje zwykle drogi oddechowe bydła. Natomiast podtypy 2a oraz 2b są izolowane głównie z owrzodzeń narządów rozrodczych. Jednak obecnie już wiadomo, że obraz

kliniczny infekcji nie może wskazywać jednoznacznie na podtyp wirusa. Eksperymentalnie potwierdzono, że zarówno podtyp 1 może zakażać genitalia [284], [285], jak i 2a jest zdolny do infekcji dróg oddechowych [286]. W odróżnieniu od podtypu 2b, infekcje podtypem 1 i 2a wiążą się z pojawieniem ciężkich objawów chorobowych, w tym także zakażeniem płodu oraz poronieniami [287]–[290].

Występowanie IBR oraz IPV/IPB w Europie jest bardzo zróżnicowane. Za obszary wolne od tych chorób Komisja Europejska uznała Danię, Austrię, Finlandię, Szwecję oraz prowincję Bolzano we Włoszech [291]. Jednostki chorobowe powodowane przez BHV-1 były tam zwalczane poprzez likwidację wszystkich zwierząt zakażonych wirusem, co było możliwe ze względu na nieznaczny odsetek zakażonych zwierząt. W krajach o dużej ilości zakażeń, tj. Hiszpania czy Niemcy, realizowano program zwalczania infekcji szczepieniami. Stosowano tzw. szczepionki markerowe, oparte na żywym atenuowanym wirusie BHV-1, pozbawionym genu kodującego glikoproteinę gE. Białko gE w dużym stopniu odpowiada za rozprzestrzenianie się wirusa na drodze CTC zarówno w komórkach nabłonkowych, jak i nerwowych, tak więc BHV-1 pozbawiony gE jest znacznie mniej zjadliwy niż szczep terenowy. Dodatkowo, możliwe jest rozróżnienie zwierząt zakażonych i szczepionych na podstawie obecności lub braku przeciwciał anti-gE obecnych w surowicy (z ang. *Differentiating infected from vaccinated animals*, DIVA) [292]. Szczepionki oparte na inaktywowanym BHV-1 są również stosowane, jednak wykazano, że zaszczepienie żywym wirusem daje efektywniejszą ochronę [293]. Największą skuteczność, rozumianą przez najwyższy stopień stymulacji odpowiedzi komórkowej i humoralnej, ma zaszczepienie zwierząt kombinacją wirusa żywego z inaktywowanym [294]. Ostatnie badania pokazują również, że zaszczepienie ciężarnych krów indukuje swoistą odporność bierną u cieląt do 180 dnia po porodzie [295].

W Polsce choroby powodowane przez BHV-1 nie podlegają obowiązkowi zwalczania. Prowadzony jest monitoring bierny i czynny zakażeń w populacji zwierząt wrażliwych.

Poza powyższymi jednostkami chorobowymi, BHV-1 może przyczynić się także do rozwoju groźnego zespołu oddechowego bydła (ang. *Bovine Respiratory Disease Complex*, BRDC), zwanego również enzootyczną bronchopneumonią bydła lub gorączką transportową [296], [297]. Pierwotne zakażenie wirusowe powoduje immunosupresję, co

prowadzi do wtórnych zakażeń bakteryjnych, a w konsekwencji do zapalenia płuc, skutkującego trwałym chęłactwem lub śmiercią zwierząt. BRDC stanowi bardzo duży problem ekonomiczny w hodowli bydła zarówno w Polsce, jak i na świecie [298].

#### **4.3.2 BHV-1 jako model do badań**

Poza opisanym w poprzednim rozdziale aspektem weterynaryjnym, BHV-1 jest również bardzo dobrym modelem do badań mechanizmów modyfikacji środowiska komórkowego przez alfaherpeswirusy. Posiada on wiele cech wspólnych zarówno w morfologii, jak i przebiegu infekcji z herpeswirusami ludzkimi (HSV-1, VZV) oraz patogenami zwierząt domowych (PRV). Jak już wspomniano, ma on bardzo wąski zakres gospodarzy, ograniczony głównie do bydła, a więc nie infekuje on ludzi ani zwierząt domowych, co znacznie ułatwia pracę laboratoryjną.

Ponadto BHV-1 może być potencjalnie stosowany jako wirus onkolityczny o szerokim spektrum zastosowania terapeutycznego [299]. Wirusy onkolityczne (z ang. *oncolytic viruses*, OV) doprowadzają do selektywnej lizy komórek nowotworowych, jednocześnie nie namnażając się w zdrowych komórkach. Terapia oparta o wirusy onkolityczne stanowi korzystną alternatywę do istniejących metod leczenia, głównie ze względu na ograniczoną toksyczność. Chociaż efektywność działania wirusów ludzkich jako OV została zaobserwowana w próbach klinicznych, odporność nabyta stanowi barierę w ich zastosowaniu terapeutycznym [300]. W związku z tym atrakcyjną alternatywę stanowi użycie wirusów zwierzęcych, w tym BHV-1. Replikacja oraz namnażanie BHV-1 w zdrowych komórkach ludzkich jest bardzo mocno ograniczona [301]. Natomiast, na infekcję BHV-1 pozostają wrażliwe ludzkie komórki transformowane nowotworowo lub immortalizowane [301]. W celu oszacowania potencjału onkolitycznego BHV-1, przeprowadzono wysokoprzepustowy screening replikacji wirusa i cytotoxyczności na panelu 60 nowotworowych linii komórkowych, w tym m. in. komórek czerniaka, nowotworów płuc, piersi, jajników, prostaty, nerek i białaczek. Ponad 72% linii komórkowych z tego panelu okazało się być permissywne dla infekcji BHV-1, co korespondowało z obniżeniem żywotności komórek nowotworowych [302]. Obecnie nie są znane determinanty komórek nowotworowych warunkujące permissywność dla BHV-1. Wiadomo jednak, że wrażliwość na BHV-1 nie jest związana z zaburzeniami sygnalizacji

interferonu typu I [301]. Potencjalnym czynnikiem warunkujący permissywność komórek nowotworowych na BHV-1 mogą być mutacje w białku KRAS [302], nadekspresja białka nektynopodobnego-5 (z ang. *nectin-like protein 5*, Necl-5) na powierzchni komórek nowotworowych [303], [304] czy redukcja ilości deacetylaz histonowych w trakcie infekcji, prowadząca do zniszczeń DNA w komórkach nowotworowych [305].

#### 4.3.3 Porównanie budowy i cyklu replikacyjnego BHV-1 do innych alfaherpeswirusów

BHV-1 należy do rodzaju *Varicellovirus*. Charakteryzuje się typową dla alfaherpeswirusów budową. Posiada genom w postaci linowego dsDNA, kapsyd o symetrii ikozaedralnej z otaczającymi go białkami tegumentu i osłonką z zakotwiczonymi glikoproteinami [306] (**Ryc. 2**). Genom BHV-1 należy do klasy D, ma długość ok. 135-140 kbp, z czego segment UL stanowi ok. 104 kbp a segment US ok. 10 kbp [307]. Segmenty rozdzielone są przez sekwencje powtórzeniowe – IR oraz TR (**Ryc.3**). Zawartość par GC to średnio 72% [272]. W sekwencji genomu wyróżniono 67 unikatowych otwartych ramek odczytu (z ang. *open reading frame*, ORF) oraz dwie zduplikowane [307]. Metodą spektrometrii masowej wraz z mapowaniem proteogenomicznym, potwierdzono ekspresję z 57 ORF oraz odkryto wiele peptydów nieprzypisanych do żadnej z wcześniej zidentyfikowanych ramek odczytu, w tym także nowe białko ORF-A, wielkości 55 kDa [308].

Genom BHV-1 koduje dziewięć glikoprotein – gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL, gK oraz UL 49.5, tzw. „fałszywą glikoproteinę”, która u BHV-1, w odróżnieniu od innych alfaherpeswirusów, nie występuje w formie glikozylowanej [309].

Podobnie jak w przypadku innych alfaherpeswirusów, produktywna infekcja BHV-1 prowadzi do powstania dużej ilości wirionów potomnych, rozprzestrzeniających się w obrębie organizmu i na kolejnych gospodarzy. Inicjacja infekcji zachodzi w komórkach nabłonkowych, poprzez oddziaływanie gC z proteoglikanami. Glikoproteina gC BHV-1, w odróżnieniu od jej homologa w VZV [310], nie jest jednak konieczna do infekcji zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [311]. Następnie, tak jak w przypadku PRV i HSV-1, dochodzi do związania receptora komórkowego przez gD. Obecnie wyróżnia się trzy klasy takich receptorów: (I) nektyny i białka Necl; (II) HVEM (z ang. *herpesvirus entry mediator*) oraz (III) 3-O-sulfonowane pochodne siarczanu heparanu (3-OST HS) [56]. Najczęściej

wykorzystywanym przez alfaherpeswirusy receptorem jest nektyna-1. Oddziałują z nią homologi gD BHV-1, HSV-1, PRV oraz HSV-2 [312]–[314]. Białko gD BHV-1 wykazuje dość słabe powinowactwo względem nektyny-1, w porównaniu do jego homologów w HSV-1 i PRV, co może sugerować użycie innego receptora w trakcie infekcji [313], [315]. Kolejnym receptorem umożliwiającym wnikanie BHV-1 i PRV do komórek jest receptor wirusa polio (Necl-5 lub CD155) [312]. Ten receptor nie jest jednak wykorzystywany przez wirusa HSV-1. Dwie pozostałe klasy receptorów używane są przez wirusy HSV-1 (HVEM i 3-OST HS) [316]–[318] i HSV-2 (HVEM) [56].

Po infekcji produktywnej w komórkach nabłonkowych, zarówno HSV-1 jak i BHV-1 przechodzą w stan latencji w zwojach nerwów czuciowych ośrodkowego układu nerwowego [124], [319], [320]. Infekcja latentna BHV-1 ograniczona jest do ekspresji genu LR (z ang. *latency related gene*). W odróżnieniu od latencji HSV-1, podczas której produkowane są tylko transkrypt LAT i miRNA (**Podrozdział 4.1.3**), w przypadku BHV-1 w trakcie latencji pojawia się też białko ORF2, będące produktem genu LR [321]. Reaktywacja BHV-1 ze stanu latencji, tak jak u innych alfaherpeswirusów, zachodzi głównie pod wpływem czynników stresowych [320], [322].

#### **4.3.4 Bezpośredni transport międzykomórkowy wirusa BHV-1**

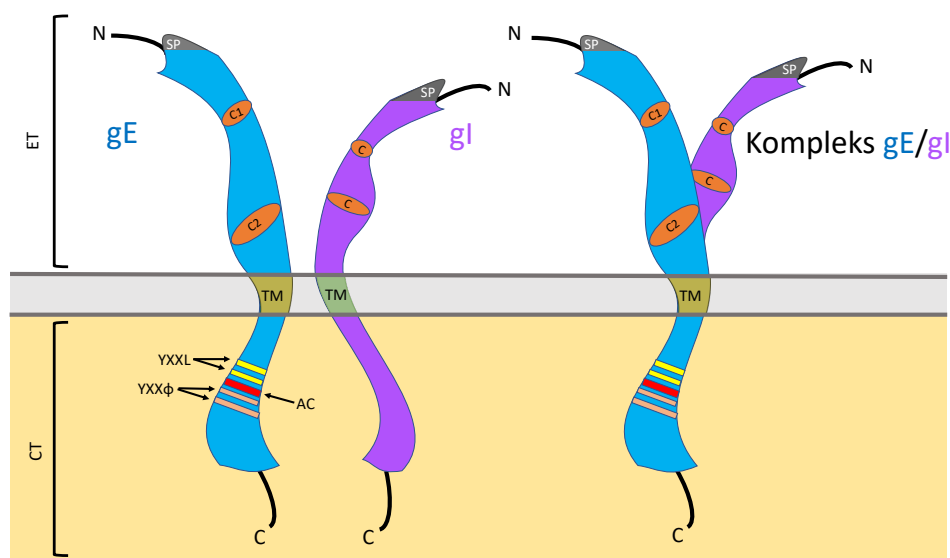
Dla wirusa BHV-1 do tej pory zdefiniowano cztery mechanizmy rozprzestrzeniania się na drodze CTC – przejście przez synapsy nerwowe, transmisję przez połączenia komórkowe oraz indukcję tworzenia struktur aktywnych i TNT (**Tabela 2, podrozdział 4.1.2**). Bardzo ważną rolę w rozprzestrzenianiu się BHV-1 za pośrednictwem połączeń komórkowych i przez synapsy nerwowe pełni kompleks glikoprotein gE/gI [225], [227]. Za kluczowy czynnik w tworzeniu wypustek aktywnych uznano kinazę US3 [197]. W badaniach nad indukcją tworzenia TNT, Jansens i wsp. także wskazali na istotną rolę tej kinazy wirusowej w przypadku wirusa PRV [168]. W komórkach infekowanych BHV-1 wykazano obecność zarówno białka gE jak i US3 w TNT [172].

##### **4.3.4.1 Rola kompleksu gE/gI w „cell-to-cell spread” wirusa BHV-1**

Glikoproteina E oraz glikoproteina I są produktami konserwowanych genów u wszystkich alfaherpeswirusów - odpowiednio *us8* oraz *us7*. Należą one do pierwszej

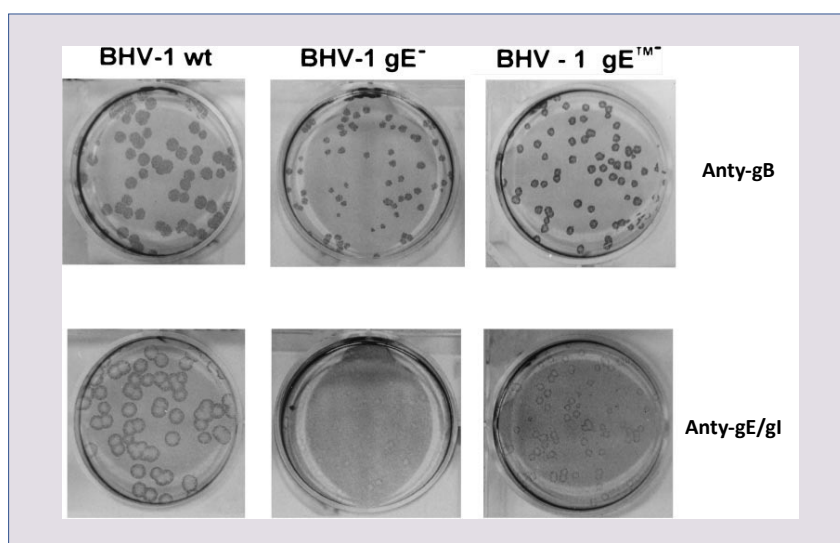


klasy białek przezbłonowych, z zewnątrzkomórkowymi domenami N-końcowymi (z ang. *extracellular domain*, ET), domenami C-końcowymi po stronie cytoplazmatycznej (z ang. *cytoplasmic domain*, CT) oraz domeną przezbłonową (z ang. *transmembrane domain*, TM), kotwiczącą te białka w błonie komórkowej (**Ryc. 14**). Polipeptyd gE złożony jest z 575 reszt aminokwasowych, a jego dojrzała forma, na skutek modyfikacji potranslacyjnych, ma masę molekularną równą 92 kDa [323]. W przypadku gI, polipeptyd składa się z 382 reszt aminokwasowych, a jego dojrzała forma, po modyfikacjach potranslacyjnych, ma masę 61,5 kDa. W części C-końcowej gI dochodzi do odcięcia fragmentu wielkości 16 kDa zawierającego domenę CT oraz TM i związania fragmentu wielkości 45 kDa z gE [323]. Kompleks gE/gI stabilizowany jest przez wiązania hydrofobowe. Formowany jest w komórkach zainfekowanych wirusem BHV-1 już ok. 8 h po infekcji [324]. Lokalizuje się głównie w błonie komórkowej i aparacie Golgiego oraz jest składnikiem osłonki wirusowej. Za formowanie kompleksu odpowiada domena zewnątrzkomórkowa gE. Najmniejszy możliwy fragment gE wiążący gI to 246 reszt aminokwasowych [225]. Zawiera on jeden z dwóch konserwowanych rejonów bogatych w cysteinę (C1) [225]. Struktury krystaliczne obu białek oraz kompleksu nie zostały do tej pory poznane dla żadnego alfa herpeswirusa.



**Ryc. 14: Schemat budowy dojrzałych form gE, gI oraz kompleksu gE/gI wirusa BHV-1.** AC – region aminokwasów kwaśnych (z ang. *acidic cluster*); C – konserwowane reszty cysteiny; CT – domena cytoplazmatyczna (z ang. *cytoplasmic domain*); ET – domena zewnątrzkomórkowa (z ang. *extracellular domain*); SP – sekwencja sygnałowa (z ang. *signal peptide*); TM – domena przezbłonowa (z ang. *transmembrane domain*); YXXL oraz YXXΦ – konserwowane motywy tyrozynowe.

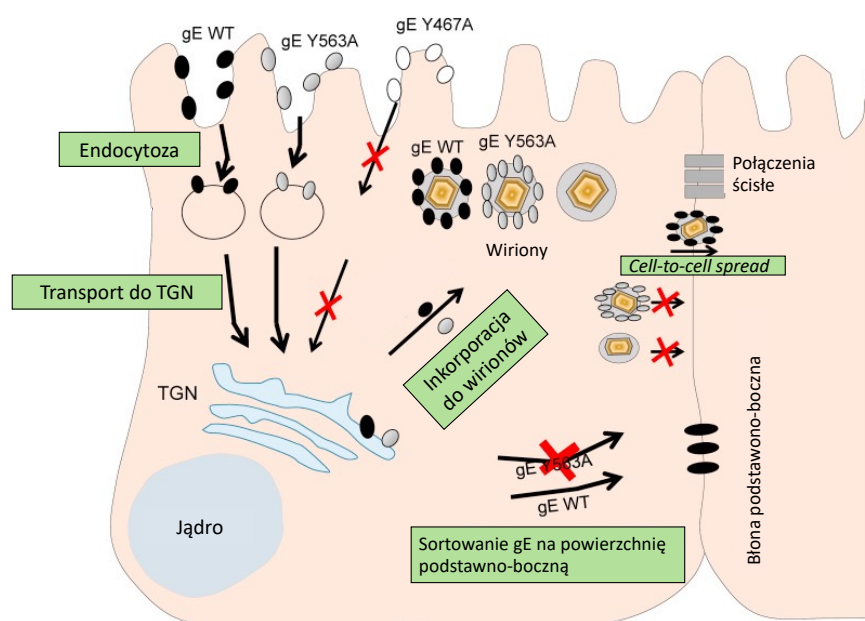
Heterodimer gE/gI nie jest konieczny do replikacji wirusa BHV-1 zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* oraz nie bierze udziału w transmisji na drodze CFE. Natomiast pełni bardzo ważną rolę w rozprzestrzenianiu się BHV-1 na drodze CTC przez połączenia komórkowe oraz synapsy nerwowe. *In vitro* mutanty pozbawione genu kodującego gE formują łyśinki wirusowe znacznie zmniejszonych rozmiarów w porównaniu do typu dzikiego wirusa (**Ryc. 15**) [155], [225], [325], [326]. *In vivo* brak gE skutkuje upośledzeniem transportu aksoplazmatycznego postępującego z ciała komórki nerwu trójdzielnego do zakończeń aksonów w nozdrzach zainfekowanego bydła [325], [327].



**Ryc. 15:** Porównanie wielkości łyśinek wirusowych formowanych przez wirusa BHV-1 WT, rekombinanta pozbawionego białka gE (BHV-1 gE<sup>-</sup>) oraz rekombinanta pozbawionego domeny TM i CT białka gE (BHV-1 gE<sup>TM</sup>). łyśinki wirusowe wybarwiono immunochemicznie pięć dni po infekcji za pomocą przeciwciał anty-gB oraz anty-gE/gI. Zaadaptowano z Tyborowska i wsp. 2000 [225].

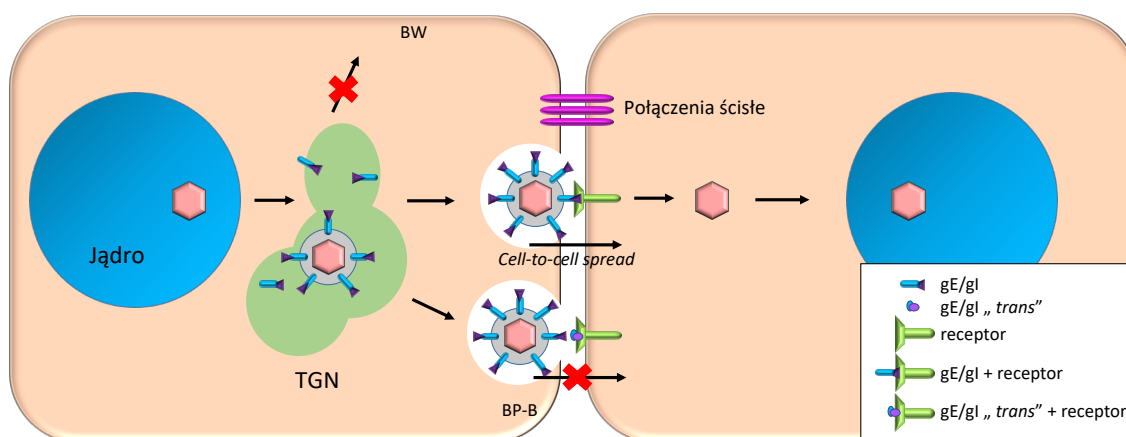
Jak już wspomniano w **podrozdziale 4.2.2**, kompleks gE/gI odpowiedzialny jest za sortowanie wirionów na powierzchnię podstawno-boczną spolaryzowanych komórek, w miejsca połączeń komórkowych. Kluczową rolę w tym procesie pełni domena cytoplazmatyczna gE [225], [325], [328], [329]. Tak jak w przypadku całkowitego braku gE, mutanty wirusowe pozbawione domeny cytoplazmatycznej formują niewielkie łyśinki (**Ryc.15**) [225] jak również są upośledzone pod kątem transportu aksoplazmatycznego postępującego *in vitro* [330] oraz *in vivo* [329]. W domenie cytoplazmatycznej gE znajdują się charakterystyczne dla białek przezbłonowych motywy tyrozynowe YXXL/YXXφ (Y-tyrozyna, X – dowolna reszta aminokwasowa, L-leucyna, φ – reszta aminokwasów hydrofobowych). Są one konserwowane wśród wszystkich alfaherpeswirusów i stanowią sygnał do endocytozy gE, transportowania gE do sieci trans aparatu Golgiego, sortowania

gE na powierzchnię podstawno-boczną komórek i końcowo do sortowania cząstek wirusowych do połączeń międzykomórkowych [216], [329], [331]–[334]. W przypadku BHV-1, domena cytoplazmatyczna gE ma długość 125 reszt aminokwasowych i posiada kilka potencjalnych motywów sortujących oraz regulujących transport wewnątrzkomórkowy. Wśród nich znajdują się dwa motywy YXXL –  $_{457}YDIL_{460}$  i  $_{467}YTSL_{470}$ , dwa motywy YXX $\Phi$  –  $_{513}YDLA_{516}$  i  $_{563}YTVV_{566}$  oraz rejon aminokwasów kwaśnych zawierający reszty seryny, które są potencjalnymi miejscami fosforylacji dla kinazy kazeinowej II [329] (**Ryc. 14**). Wg najnowszej literatury, motywy  $_{467}YTSL_{470}$  oraz  $_{563}YTVV_{566}$  są odpowiedzialne za regulację transportu wewnątrzkomórkowego gE oraz za kontrolę procesu CTC [227] (**Ryc. 16**). Mutacja Y467A w motywie  $_{467}YTSL_{470}$  wpływała na endocytozę gE, transport gE do sieci trans aparatu Golgiego oraz na inkorporację gE do wirionów potomnych. W przypadku motywu  $_{563}YTVV_{566}$ , mutacja Y563A wpływała na sortowanie białka gE na powierzchnię podstawno-boczną komórki. Podwójna mutacja motywów tyrozynowych Y467A/Y563A skutkowała zmniejszeniem łysek wirusowych o ok. 46% w odniesieniu do BHV-1 WT. Był to porównywalny poziom redukcji wielkości łysek do całkowitego braku domeny CT (redukcja o ok. 53%), co wskazuje na ważną rolę obu motywów w CTC.



**Ryc. 16: Rola motywów tyrozynowych  $_{467}YTSL_{470}$  i  $_{563}YTVV_{566}$  w regulacji transportu wewnątrzkomórkowego gE oraz procesu CTC wirusa BHV-1.** W ramkach oznaczono kolejne etapy transportu wewnątrzkomórkowego gE oraz sortowanie gE i wirionów na powierzchnię podstawno-boczną błony komórkowej. gE WT – niezmutowana forma białka gE, gE Y563A oraz gE Y467A – formy gE z mutacjami w motywach tyrozynowych, TGN – sieć trans-Golgi. Zaadaptowano z: Yezid i wsp. 2020 [227].

Kompleks gE/gI kolokalizuje w komórkach spolaryzowanych ze znajdującą się w połączeniach przylegających  $\beta$ -kateniną [215], [227]. W badaniach Polcicova i wsp. wysunięto hipotezę, iż gE/gI musi oddziaływać w obrębie połączeń komórkowych ze specyficznym receptorem (**Ryc. 17**) [335]. Na dowód tej hipotezy badacze wskazują, poza już wspomnianą lokalizacją kompleksu w połączeniach komórkowych, na hamowanie ścieżki CTC przy ekspresji gE/gI w opcji *trans*, co miałyby świadczyć o „zablokowaniu” specyficznego receptora [336]. Podobną zależność ten sam zespół badaczy opisał kilka lat wcześniej dla glikoproteiny gD, której rozpuszczalna forma skutecznie blokowała nektynę-1, a co za tym idzie infekcję ze środowiska zewnątrzkomórkowego [337]. Do tej pory nie zidentyfikowano interakcji heterodimeru gE/gI z żadnym czynnikiem komórkowym. Wykazano jedynie oddziaływanie gE z białkami komórkowymi w infekcji wirusem VZV [338]–[340] oraz HSV-1 [341]. W infekcji wirusem VZV białko gE oddziaływało z enzymem degradującym insulinę (z ang. *insulin-degrading enzyme*, IDE), którego zablokowanie skutkowało zahamowaniem zarówno drogi CFE jak i CTC przez połączenia międzykomórkowe. Natomiast w przypadku wirusa HSV-1 wykazano interakcję gE z prohibityną-1 (PHB1), która wg Watanabe i wsp. reguluje transmisję na drodze CTC poprzez aktywację szlaku MAPK/ERK.



**Ryc. 17: Model oddziaływania kompleksu gE/gI ze specyficznym receptorem w obrębie połączeń komórkowych w CTC.** Sortowanie wirionów w TGN do połączeń komórkowych, gdzie kompleks gE/gI oddziałuje ze specyficznym receptorem umożliwiając CTC. Zablockowanie receptora przez transekspresję kompleksu gE/gI skutkuje zahamowaniem drogi CTC. BP-B – błona podstawno-boczna; BW – błona wierzchołkowa; TGN – sieć trans-Glogi.

#### 4.3.4.2 Kinaza US3 wirusa BHV-1 jako kluczowy czynnik w indukcji tworzenia wypustek oraz TNT

Białko US3 jest silnie konserwowane w podrodzinie *Alphaherpesvirinae* i posiada homologi u wszystkich jej reprezentantów. US3 jest kinazą serynowo-treoninową zawierającą domenę kinazową wielkości ok. 280-300 reszt aminokwasowych z regionem wiążącym ATP oraz centrum katalitycznym [342]. W zainfekowanej komórce, US3 lokalizuje się w jądrze, cytoplazmie oraz w okolicach błony komórkowej. Kinaza US3 jest również białkiem tegumentu alfaherpeswirusów. US3 pełni wiele funkcji w trakcie infekcji. Jest odpowiedzialne m. in. za hamowanie represji transkrypcji [343]–[345], uwolnienie kapsydów wirusowych z jądra komórkowego [74], [346]–[350], modulację odpowiedzi immunologicznej gospodarza [351]–[354], rearanżację cytoszkieletu komórkowego [197], [349], [355], [356] oraz przeciwdziałanie apoptozie zainfekowanych komórek [354], [357]–[362].

Kinaza US3 wirusa BHV-1 jest białkiem o masie molekularnej równej 58 kDa. Tak jak w przypadku innych alfaherpeswirusów, nie jest konieczna do namnażania wirusa w hodowlach *in vitro* [363]–[365]. W odróżnieniu od MDV oraz PRV, wielkość łysinek wirusowych formowanych przez mutanty delecyjne pod względem genu *us3* nie odbiega w sposób znaczny od tych formowanych przez BHV-1 WT [362], [366], [367]. US3 wirusa BHV-1 jest stosunkowo słabo poznanym białkiem. Do tej pory zostało ono zbadane pod kątem oddziaływania z białkiem VP22 [368], hamowania apoptozy [362], zmian w dystrybucji lamin jądrowych [369] oraz rozprzestrzeniania się wirusa na drodze CTC [172], [197].

W odniesieniu do CTC, aktywność US3 wirusa BHV-1 doprowadza do drastycznych zmian w architekturze cytoszkieletu komórkowego, co skutkuje utratą kształtu komórek w związku z zaburzeniami rozmieszczenia włókien kurczliwych oraz formowaniem długich wypustek komórkowych (**Podrozdział 4.2.2**) [197]. W CTC wypustki umożliwiają bezpośredni kontakt pomiędzy oddalonymi od siebie komórkami, co pozwala na zwiększenie tempa oraz zasięgu rozprzestrzeniania się wirusa. Punktowa mutacja K282A w centrum katalitycznym US3 całkowicie hamowała tworzenie wypustek w komórkach transdukowanych rekombinowanym bakulowirusem [197]. Dokładny mechanizm indukcji powstawania wypustek nie został do tej pory poznany.

Tak jak w przypadku wirusa PRV [168], aktywność kinazy US3 wirusa BHV-1 również wpływa na tworzenie nanorurek międzykomórkowych. W rozprawie doktorskiej dr Mirosławy Panasiuk pokazano, iż w komórkach nabłonkowych oraz fibroblastach zainfekowanych wirusem BHV-1 WT powstaje odpowiednio o 30% i 50% więcej połączeń TNT w porównaniu do BHV-1  $\Delta$ US3 jak również mutantu produkującego nieaktywną formę kinazy (mutacja K282A w centrum katalitycznym US3) [370].

## **4.4 Techniki badania *cell-to-cell spread***

### **4.4.1 Immunofluorescencja kontra analiza przyżyciowa**

Klasyczną metodą badania bezpośredniego transportu międzykomórkowego jest test wielkości tysinek wirusowych, formowanych w hodowlach komórkowych *in vitro*. By wielkość tysinek przekładała się na rzeczywisty stopień rozprzestrzeniania się wirusa na drodze CTC, konieczne jest zastosowanie takich warunków eksperymentalnych, by zablokować wirusa infekującego komórki ze środowiska zewnątrzkomórkowego. W tym celu można użyć mediów hodowlanych z dodatkiem agarozy lub metylocelulozy, stanowiących barierę mechaniczną dla cząstek wirusowych infekujących komórki poprzez CFE [371], [372]. Do zablokowania rozprzestrzeniania się wirusów, można także wykorzystać przeciwciała neutralizujące wirusa, które uniemożliwiają oddziaływanie białek wirusowych z receptorami komórkowymi, ale jednocześnie nie zakłócają tworzenia połączeń międzykomórkowych [155], [172], [181], [373]–[375].

Oprócz relatywnie prostych do wykonania eksperymentów w hodowlach komórkowych, szeroki wachlarz technik obrazowania mikroskopowego stanowi obecnie standard w analizie transmisji wirusa za pośrednictwem CTC. Od lat 50-tych XX wieku immunofluorescencja (IF) połączona z analizą mikroskopową była podstawowym narzędziem pozwalającym na wizualizację alfaherpeswirusów w zainfekowanej tkance. Pierwszymi wirusami zobrazowanymi przy użyciu tych technik były VZV w 1954 roku [376] i HSV-1 w 1956 roku [377]. W obecnych czasach, dzięki połączeniu immunofluorescencji i fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej możliwa była detekcja białek wirusowych m. in. w połączeniach komórkowych [215], filopodiach [249], TNT [168], [172] oraz w obrębie synapsy wirusologicznej [207]. Pomimo szerokiego zastosowania immunofluorescencji w biologii molekularnej i komórkowej, nie jest to metoda wolna od artefaktów, których

pojawienie się jest związane z samą procedurą przygotowania preparatu mikroskopowego. Dla obserwacji wewnątrzkomórkowych białek metodą immunofluorescencji, potrzebne są utrwalenie i permeabilizacja komórek, zwykle osiągnięte poprzez sieciowanie białek za pomocą paraformaldehydu, precypitację białek i ekstrakcję lipidów rozpuszczalnikami organicznymi lub detergentami. Mnogość i zmienność odczynników używanych w protokole immunofluorescencji może doprowadzić do nadmiernej ekstrakcji treści komórkowej (co może skutkować utratą lub zmianą lokalizacji wewnątrzkomórkowej danego antygeny) lub do niewystarczającego stopnia permeabilizacji błony komórkowej (co wiąże się z kolei ze słabą dostępnością antygeny dla przeciwciał) [378].

W związku ze skomplikowaną strukturą wirionów, artefakty immunofluorescencji są szczególnie problematyczne w eksperymentach dotyczących wizualizacji cząstek alfaherpeswirusów. Przykładowo, w badaniach Antinone i wsp., w których przeprowadzano immunodetekcję białka kapsydowego VP5, jedynie w ok. połowie dojrzałych wirionów stwierdzono jego obecność [379]. Dopiero po odpowiednim oczyszczeniu dojrzałych cząstek wirusowych, wspomniane białko udało się wybarwić immunofluorescencyjnie [379]. Z innym problemem dotyczącym struktury wirionów zetknęli się Newcomb i wsp., którzy wykazali, że zmieniająca się w czasie strukturalna organizacja tegumentu obniża wrażliwość na ekstrakcję detergentem w procedurze IF, a więc możliwość wybarwienia konkretnych białek tegumentu zależy od etapu infekcji wirusowej [380].

Jak już wspomniano, transmisja wirusów za pośrednictwem CTC jest bardzo szybkim i dynamicznym procesem. W związku z tym, ogromnie ważny w badaniach nad tą drogą infekcji jest kontekst czasoprzestrzenny, którego brakuje w klasycznym teście wielkości łysinek, w IF a także w mikroskopii elektronowej [381]. Dlatego też, analiza przyżyciowa infekcji z użyciem fluorescencyjnych rekombinantów wirusowych stanowi najlepsze narzędzie do analizy tego procesu.

Pierwsze herpeswirusy kodujące fluorescencyjne białka fuzyjne powstały pod koniec lat 90-tych ubiegłego wieku. W 1997 roku Elliot i O'Hare skonstruowali mutanta HSV-1 z fuzją VP22 z EGFP (z ang. *enhanced green fluorescence protein*) [382]. Niedługo potem, w 1998 roku Desai i Person dokonali fuzji EGFP do małego białka kapsydowego – VP26 wirusa HSV-1, która umożliwiła monitorowanie akumulacji białek kapsydowych

w jądrze oraz cytoplazmie zainfekowanych komórek [383]. W ciągu ostatnich 30 lat skonstruowano wiele rekombinantów alfa herpeswirusów z wyznakowanymi fluorescencyjnie białkami kapsydowymi, tegumentu, glikoproteinami a także białkami niestrukturalnymi. Przykłady fluorescencyjnych rekombinantów HSV-1, PRV oraz BHV-1 zestawiono w **tabeli 3**.

**Tab. 3: Przykłady wyznakowanych fluorescencyjnie białek strukturalnych alfa herpeswirusów.** W nawiasach kwadratowych umieszczono odnośniki literaturowe.

Białko	HSV-1	PRV	BHV-1
<b>Kapsyd</b>			
VP26	[88], [383]	[237]	[384], [385]
UL25	[386]	[387]	-----
<b>Tegument</b>			
VP1/2	[388]	[387], [389]	-----
VP13/14 (VP8)*	[390]	[389]	[391], [392]
VP22	[382], [388], [393]	[389], [394]	[395]
<b>Oślonka</b>			
gM	[396]	[72], [396], [397]	-----
gE	[398]	[243], [328]	[172]
gI	-----	[328]	-----
<b>Kapsyd + oślonka</b>			
gE + VP26	-----	-----	[172]
gD + VP26	[399]	[400]	-----

\*VP8 jest analogiem VP13/14 dla wirusa BHV-1.

Analiza przyżyciowa (z ang. *live cell imaging*) polega na obrazowaniu żywych komórek, poprzez wykonanie od kilku do kilkudziesięciu zdjęć w jednostce czasu, czego efektem jest powstanie filmu poklatkowego (z ang. *time-lapse microscopy*), demonstrującego w odpowiednio przyspieszonym tempie dynamikę danego procesu biologicznego, w tym także transmisji wirusa na drodze CTC. Przykładowo, analiza przyżyciowa neuronów infekowanych fluorescencyjnymi rekombinantami PRV wykazała, że zarówno kapsydy jak i opłaszczony cząstki wirusowe transportowane są w aksonach i że białko US9 potrzebne jest do transportu aksooplazmatycznego postępującego

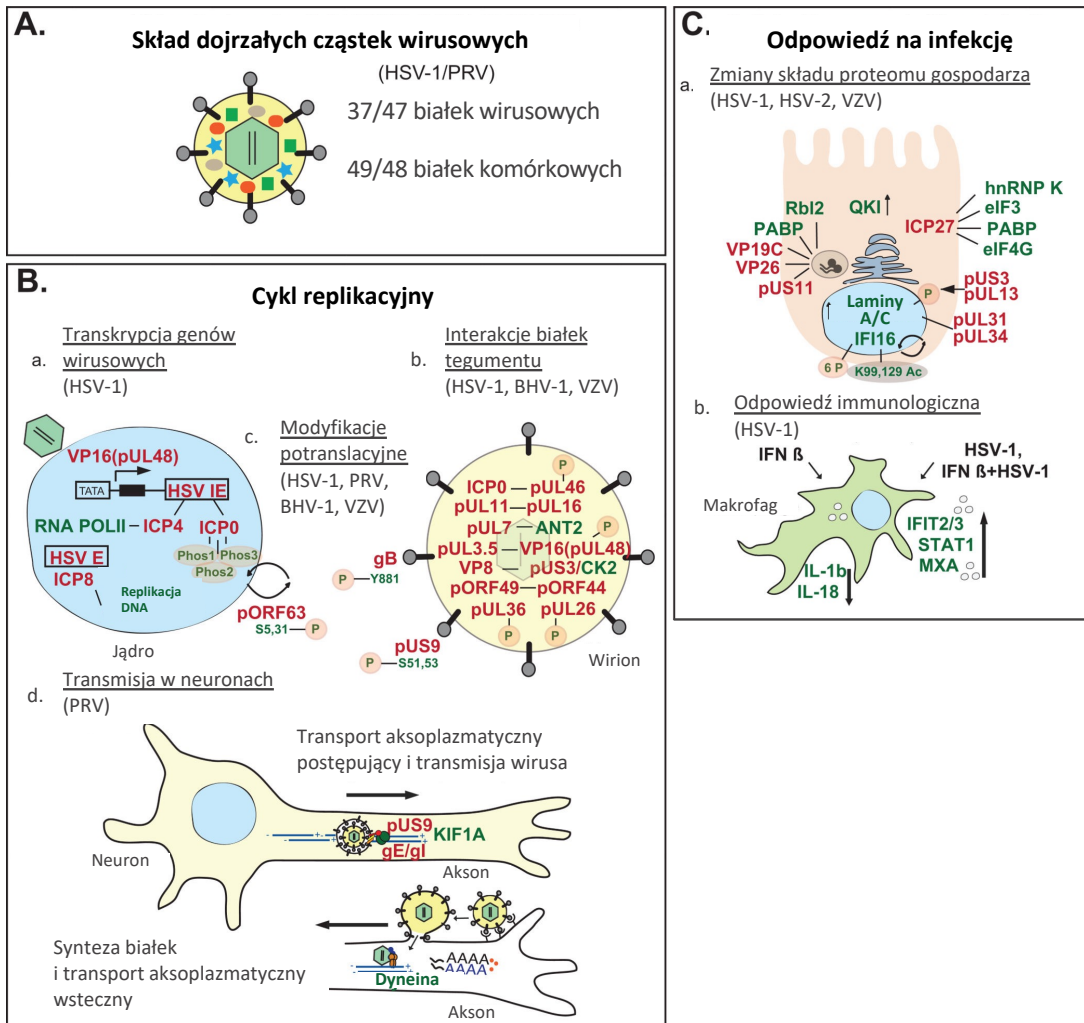


wirionów potomnych [397]. Obserwacje przyżyciowe fluorescencyjnych mutantów HSV-1 i PRV pozwoliły także na oszacowanie liczby cząstek wirusów infekujących komórki nabłonkowe z zakończeń neuronów [401]. Ponadto ta technika pozwoliła na zobrazowanie wirionów BHV-1 przemieszczających się w środowisku przeciwciał neutralizujących wewnątrz TNT [172].

#### **4.4.2 Badania interakcji białek wirusowych i komórkowych w CTC w czasie rzeczywistym – proteomika + mikroskopia**

W ciągu ostatnich dwudziestu lat analiza proteomiczna z wykorzystaniem spektrometrii masowej (z ang. *mass spectrometry-based proteomics*, MSBP) stała się niezwykle użytecznym narzędziem w badaniu cyklu życiowego oraz patogenezy alfaherpeswirusów. Technika MSBP umożliwiła m. in **(Ryc. 18)**:

- (I) Analizę składu dojrzałych cząstek wirusowych wirusów PRV, BHV-1, BHV-4 oraz HSV-1 [12], [13], [28], [402].
- (II) Badanie interakcji białek wirusowych i komórkowych na etapach replikacji DNA wirusowego, transkrypcji genów oraz translacji białek wirusowych [403]–[406].
- (III) Określenie sieci interakcji białek tegumentu w przebiegu infekcji wirusowej PRV [407], [408], HSV-1 [409], [410], BHV-1 [411] i VZV [412].
- (IV) Analizę modyfikacji potranslacyjnych białek wirusowych i komórkowych [12], [413]–[416].
- (V) Badanie interakcji białek komórkowych i wirusowych w rozprzestrzenianiu się wirusów w komórkach nerwowych [243], [417]–[419].
- (VI) Analizę globalnych zmian proteomu infekowanych komórek [420], [421]. oraz odpowiedzi immunologicznej na infekcję wirusową [422]–[425].

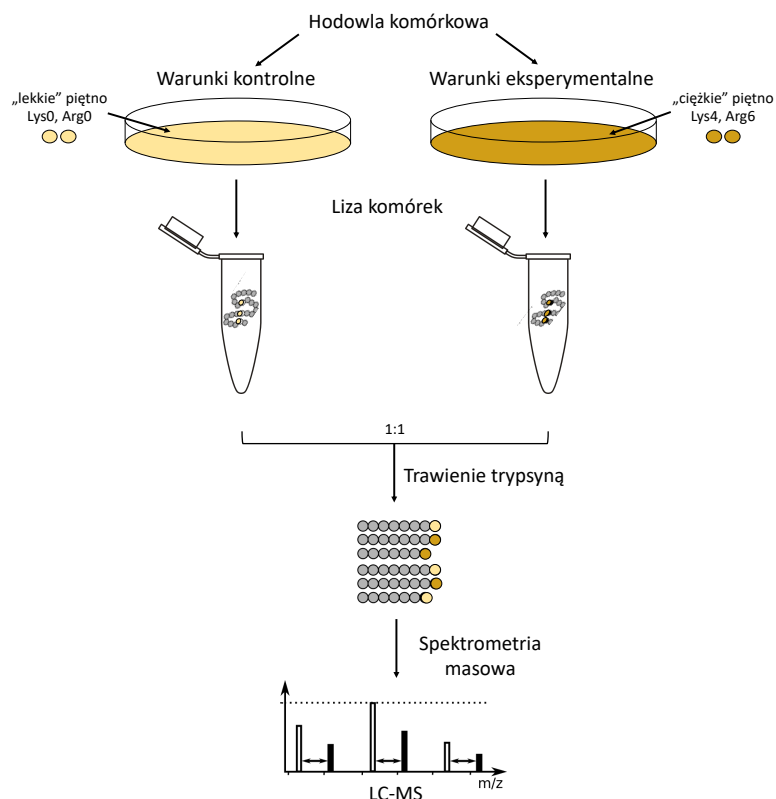


**Ryc. 18: Przykładowe zastosowania MSBP w badaniu patogenezy i cyklu życiowego alfaherpeswirusów. (A.)** Analiza składu wirionów HSV-1 i PRV przy pomocy MSBP potwierdziła obecność odpowiednio 37 i 49 białek wirusowych oraz 49 i 48 białek komórkowych. **(B.)** Badanie cyklu replikacyjnego wirusa. (a.) Dzięki MSBP zidentyfikowano partnerów komórkowych białek ICP4 oraz ICP8. (b.) Metody MSBP przyczyniły się do identyfikacji partnerów komórkowych białek tegumentu (np. UL7 i ANT2) oraz sieci oddziaływań między białkami tegumentu (np. UL11 i UL16). (c.) Analiza modyfikacji potranslacyjnych z wykorzystaniem MSBP ujawniła fosforylację białek US9 wirusa PRV, gB i ORF63 wirusa VZV oraz trzy regiony fosforylacji (Phos1-3) w białku ICP0 wirusa HSV-1. (d.) Przy pomocy MSBP zidentyfikowano oddziaływanie US9 wirusa PRV i komórkowego KIF1A oraz dowiedziono, że w aksonach dochodzi do lokalnej syntezy białek komórkowych po infekcji PRV. **(C.)** Analiza odpowiedzi na infekcję. (a.) Analiza proteomu gospodarza po infekcji alfaherpeswirusowej wykazała zmiany w poziomie białek komórkowych (np. Rbl2, PABP, QKI, lamin A/C, hnRNP K, eIF3, eIF4G, IFI16). (b.) Dzięki MSBP wykazano zwiększoną sekrecję IFIT2, IFIT3, STAT1 oraz MXA oraz obniżenie sekrecji IL-1b i IL-18 w komórkach stymulowanych interferonem i infekowanych HSV-1. Czerwoną czcionką oznaczono białka wirusowe, zieloną czcionką oznaczono białka komórkowe. P – fosforylacja. Zaadaptowano z: Engel i wsp. 2015 [426].

Poza identyfikacją białek, MSBP może zapewnić także analizę ilościową, co jest szczególnie użyteczne w badaniu oddziaływań konkretnych białek wirusowych z innymi białkami (tzw. interaktomu), dla określenia składu wirionów lub zmian w poziomie białek komórkowych na skutek infekcji. Analiza ilościowa ma zwykle w tym aspekcie charakter

względny (z ang. *relative quantification*) i polega na porównaniu ilości poszczególnych białek proteomu w warunkach eksperymentalnych (np. infekowanych komórek) do proteomu w warunkach kontrolnych (np. nieinfekowanych komórek). W przypadku herpeswirusów, do tego celu stosowane jest znakowanie izotopowe z użyciem znaczników izobarycznych iTRAQ (z ang. *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification*), znaczników ICAT (z ang. *Isotope-coded Affinity Tag*) lub techniką znakowania stabilnym izotopem w hodowli komórkowej (z ang. *Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Culture*, SILAC) [426], [427].

W badaniach proteomicznych alfa herpeswirusów, najpopularniejszą techniką znakowania izotopowego jest SILAC [426]. Metoda ta polega na inkorporacji do białek reszt aminokwasowych lizyny i/lub argininy zawierających stabilne izotopy węgla ( $^{13}\text{C}$ ) lub azotu ( $^{15}\text{N}$ ) (**Ryc.19**). Najprostszym układem eksperymentalnym w SILAC jest prowadzenie hodowli w warunkach kontrolnych w pożywce zawierającej „lekkie” piętno aminokwasów (węgiel  $^{12}\text{C}$ ), a w przypadku warunków eksperymentalnych „ciężkie” piętno aminokwasów (węgiel  $^{13}\text{C}$ ). Zarówno „ciężkie”, jak i „lekkie” piętno włączane jest do białek komórkowych lub wirusowych w trakcie ich syntezy w hodowli komórkowej. Po lizie białka komórek hodowanych w warunkach kontrolnych oraz eksperymentalnych łączy się w stosunku 1:1 i poddaje się trawieniu do peptydów przy pomocy trypsyny. Ponieważ peptydy zawierające „lekkie i „ciężkie” piętno są pod względem chemicznym identyczne, będą one eluowane w tej samej frakcji z kolumny, a co za tym idzie będą wykrywane symultanicznie w spektrometrze masowym. Identyczne peptydy o innym składzie izotopowym są rozróżniane w spektrometrze masowym dzięki różnicom w ich masie. Stosunek intensywności pików w widmie masowym dla par peptydów różniących się piętnem odzwierciedla stosunek ilości białek w warunkach kontrolnych i eksperymentalnych [428]. Jest to tak zwany stosunek wzbogacania (z ang. *enrichment ratio*), który wyrażany jest w skali  $\log_2$ . Technika SILAC została zastosowana do tej pory w kilkudziesięciu pracach naukowych dotyczących alfa herpeswirusów m. in. w analizie proteomu bydlęcych komórek infekowanych wirusem PRV [420], w badaniu składu wirionów PRV przy braku produkcji białek US3, UL47, UL49 i gE [407], w identyfikacji interaktomu białka UL21 wirusa HSV-1 [429] czy dla odróżnienia białek wirusa VZV użytego do infekcji (inokulum) od nowo syntetyzowanych białek wirusowych w infekowanych komórkach [430].



**Ryc. 19: Schemat znakowania izotopowego białek przy użyciu techniki SILAC.** LC-MS – z ang. *liquid chromatography-mass spectrometry*, m – masa, z – ładunek.

W celu ograniczenia analizy proteomicznej do identyfikacji interaktomu konkretnego białka wirusowego, niezbędne jest zastosowanie metody wzbogacania (z ang. *enrichment*). Najczęściej stosowaną metodą wzbogacania jest koimmunoprecypitacja szukanych białek wirusowych wraz z ich interaktomem. Do koimmunoprecypitacji można wykorzystać przeciwciała skierowane przeciwko konkretnemu białkom wirusowym lub przeciwciała przeciwko metkom białek fuzyjnych [381]. Zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko białkom wirusowym może wiązać się z ich słabą swoistością, co przekłada się na niewystarczające powinowactwo dla efektywnej izolacji interaktomu danego białka wirusowego. Dodatkowo przeciwciała wyprowadzone przeciwko konkretnemu białku mogą zakłócać krótkotrwałe oddziaływania z innymi białkami lub rozpoznawany przez nie epitop może stać się niedostępny ze względu na taką interakcję. Aby uniknąć tych problemów, w badaniach interaktomu białek wirusowych stosuje się fuzje białek wirusowych z metkami białkowymi, przeciwko którym dostępne są przeciwciała komercyjne. Coraz częściej do tego celu wykorzystywane są białka fluorescencyjne, które poza narzędziem do

immunoprecypitacji, dają możliwość monitorowania produkcji i lokalizacji białka wirusowego w komórce przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej [381], [426], [431]. Połączenie analizy przyżyciowej z MSBP pozwala na lepsze zrozumienie dynamiki oddziaływań białek wirusowych i komórkowych w czasie rzeczywistym, co jest szczególnie ważne w badaniu CTC. W odniesieniu do alfaherpeswirusów, połączenie tych dwóch metod zostało zastosowane m. in. do analizy interakcji białka US9 z KIF1A w transporcie aksoplamatycznym postępującym cząstek wirusowych PRV [417] oraz interakcji antywirusowego białka IFIX z białkami IE wirusa HSV-1 [432].

## 5. Cele pracy doktorskiej

Celem niniejszej pracy było określenie roli kompleksu glikoprotein gE/gI oraz kinazy US3 wirusa BHV-1 w bezpośrednim transporcie międzykomórkowym (z ang. *cell-to-cell spread*, CTC) oraz zbadanie ich oddziaływania z czynnikami komórkowymi w trakcie tego procesu.

Pracę badawczą podzielono na dwa etapy:

**Etap 1:** Analiza przyżyciowa rozprzestrzeniania się fluorescencyjnych rekombinantów wirusowych na drodze CTC w hodowlach komórkowych. W tym etapie praca badawcza obejmowała:

- Opracowanie uniwersalnego testu na określenie prędkości rozprzestrzeniania się fluorescencyjnych rekombinantów wirusowych BHV-1 na drodze CTC w żywych komórkach różnego typu (komórki transformowane i pierwotne).
- Konstrukcję rekombinantów wirusa BHV-1 kodujących białko fuzyjne VP26-mCherry.
- Analizę przyżyciową rozprzestrzeniania się rekombinanta BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry w międzykomórkowych nanorurkach (TNT).

**Etap 2:** Badanie oddziaływania kompleksu gE/gI z białkami komórkowymi w procesie rozprzestrzeniania się wirusa BHV-1 na drodze CTC. W tym etapie pracy wykorzystano fluorescencyjne mutanty BHV-1 gE-GFP oraz gETM<sup>-</sup>-GFP. Praca badawcza obejmowała:

- Optymalizację warunków infekcji oraz lizy komórek w celu przygotowania próbek do analizy w spektrometrze masowym.
- Identyfikację potencjalnych partnerów komórkowych kompleksu gE/gI w spektrometrze masowym.
- Potwierdzenie oddziaływania kompleksu gE/gI z podjednostką katalityczną  $\alpha$  białkowej fosfatazy 1 (PP1 $\alpha$ ).

## 6. Materiały

### 6.1 Linie komórkowe oraz komórki pierwotne

#### 6.1.1 MDBK (z ang. *Madin-Darby Bovine Kidney cells*)

Linia komórek nabłonkowych nerki bydłowej Madin-Darby, otrzymana z Institute of Animal Science and Health Lelystad, Holandia.

#### 6.1.2 KOP-R (z niem. *Kalb Oesopharynx*)

Linia komórek nabłonkowych izolowanych z gardła i przełyku bydłowego, otrzymana z Friedrich-Loeffler- Institut, Greifswald-Insel Riems, Niemcy.

#### 6.1.3 Pierwotne fibroblasty bydłowe

Fibroblasty bydłowe wyizolowane z fragmentu skóry pobranego z ucha cielaka, pozyskane z Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, IIMCB, Warszawa.

#### 6.1.4 F2H<sup>®</sup>-BHK (Chromotek)

Modyfikowana linia fibroblastów nerki chomika BHK-21 (z ang. *baby hamster kidney*), komponent zestawu F2H<sup>®</sup> Assay Kit (Chromotek).

### 6.2 Podłoża do hodowli komórek ssaczych

#### 6.2.1 Podłoże wzrostowe RPMI-1640 HEPES Modification (z ang. *Roswell Park Memorial Institute*), R5886, Sigma-Aldrich

Podłoże zawierające HEPES, czerwień fenolową oraz węglan sodu, suplementowane 10% płodową surowicą bydłową (z ang. *fetal bovine serum*, FBS), 200mM L-glutaminą oraz mieszanką antybiotyków AA. Używane do hodowli komórek ssaczych.

#### 6.2.2 Podłoże wzrostowe RPMI-1640 HEPES Modification (z ang. *Roswell Park Memorial Institute*), 1780, Sigma-Aldrich

Podłoże zawierające L-glutaminę oraz węglan sodu, niezawierające czerwieni fenolowej, argininy, leucyny oraz lizyny, suplementowane 10% FBS, 382  $\mu$ M L-leucyną (Sigma-

Aldrich), 218  $\mu\text{M}$  L-lysine, 288  $\mu\text{M}$  L-argininą (Sigma-Aldrich) oraz mieszanką antybiotyków AA. Używane do hodowli komórek ssaczych w toku eksperymentu SILAC. Do znakowania izotopowego w metodzie SILAC, podłoże było suplementowane aminokwasami o „ciężkim” ( $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -L-lizyna,  $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -L-arginina, Silantes) lub „średnim” piętnie ( $^2\text{H}_4$ -lizyna oraz  $^{13}\text{C}_6$ -arginina, Silantes).

### **6.2.3 Podłoże wzrostowe HMEM (z ang. *Hank's Minimum Essential Medium Liquid*), Lonza**

Podłoże zawierające HEPES oraz czerwień fenolową, suplementowane 10% FBS, 200mM L-glutaminą, roztworem NAA (z ang. *non-essential amino acids*) oraz mieszanką antybiotyków AA. Używane do hodowli komórek ssaczych.

### **6.2.4 Podłoże wzrostowe EMEM (z ang. *Minimum Essential Medium Eagle*), Sigma-Aldrich**

Podłoże zawierające węglan sodu oraz czerwień fenolową, suplementowane 200 mM L-glutaminą, 10% FBS mieszanką antybiotyków AA. Używane do hodowli komórek ssaczych.

### **6.2.5 Podłoże wzrostowe DMEM (z ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), GIBCO**

Podłoże zawierające D-glukozę, pirogronian sodu, 200 mM L-glutaminę oraz węglan sodu, suplementowane 10% FBS oraz mieszaniną antybiotyków AA lub gentamycyną. Używane do hodowli komórek ssaczych.

### **6.2.6 Podłoże wzrostowe DMEM (z ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) 10x, GIBCO**

Podłoże zawierające D-glukozę, pirogronian sodu, suplementowane 200 mM L-glutaminą, 4% FBS, mieszaniną antybiotyków AA oraz 3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Podłoże stosowane do sporządzenia 1% roztworu metylocelulozy.

## **6.2 Wirus typu dzikiego i rekombinanty wirusa BHV-1**

### **6.3.1 BHV-1 Lam**

Szczep dzikiego typu wirusa BHV-1, otrzymany z Institute of Animal Science and Health Lelystad, Holandia



### **6.3.2 BHV-1 gE-GFP**

Rekombinant wirusa BHV-1 posiadający gen kodujący białko gE w fuzji z GFP. Wirus pochodzący ze zbiorów Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów MWB UG-GUMed, skonstruowany przez Aleksandrę Szwejk.

### **6.3.3 BHV-1 gE-TM**

Rekombinant wirusa BHV-1 kodujący skróconą formę białka gE, pozbawioną domeny przebłonowej oraz cytoplazmatycznej. Wirus pochodzący ze zbiorów Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów MWB UG-GUMed, skonstruowany przez dr Jolantę Tyborowską.

### **6.3.4 BHV-1 gE-TM-GFP**

Rekombinant wirusa BHV-1 kodujący skróconą formę białka gE, pozbawioną domeny przebłonowej oraz cytoplazmatycznej, w fuzji z GFP. Wirus pochodzący ze zbiorów Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów MWB UG-GUMed, skonstruowany przez dr Michała Rychłowskiego.

### **6.3.5 BHV-1 $\Delta$ US3**

Rekombinant wirusowy pozbawiony genu us3, w miejsce którego został wprowadzony jako marker gen kodujący glutationo-S-transferazę (GST), wirus pochodzący ze zbiorów Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów MWB UG-GUMed, skonstruowany przez dr Agnieszkę Brzozowską.

### **6.3.6 BHV-1 US3 KD**

Rekombinant wirusowy z substytucją lizyny na alaninę w centrum katalitycznym białka US3 na pozycji 282, znoszącą aktywność kinazową białka, wirus pochodzący ze zbiorów Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów MWB UG-GUMed, skonstruowany przez dr Agnieszkę Brzozowską.

### **6.3.7 BHV-1 gE-GFP $\Delta$ US3**

Rekombinant wirusa BHV-1 posiadający gen kodujący białko gE w fuzji z GFP oraz pozbawiony genu *us3*, w miejsce którego został wprowadzony jako marker gen kodujący glutationo-S-transferazę (GST), wirus pochodzący ze zbiorów Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów MWB UG-GUMed, skonstruowany przez mgr Natalię Derewońko.

### **6.3.8 BHV-1 VP26-GFP (Jura)**

Rekombinant BHV-1 posiadający gen kodujący białko kapsydowe VP26 w fuzji z GFP, otrzymany z University of Zurich, Szwajcaria.

### **6.3.9 BHV-1 WT Jura**

Szczep dzikiego typu wirusa BHV-1, otrzymany z University of Zurich, Szwajcaria.

## **6.4 Przeciwciała**

6.4.1 Kozia surowica anty-BHV-1, VMRD

6.4.2 Przeciwciała mysie, monoklonalne, anty-gB BHV-1, VMRD

6.4.3 Przeciwciała mysie, monoklonalne, anty-gE/gI (Mab75), Institute of Animal Science and Health Lelystad, Holandia

6.4.4 Przeciwciała królicze, poliklonalne, anty- $\beta$ -katenina, Sigma-Aldrich

6.4.5 Przeciwciała mysie, monoklonalne, anty-gE BHV-1 (Mab3), Institute of Animal Science and Health Lelystad, Holandia

6.4.6 Królicza surowica anty-gI BHV-1, Department of Molecular Biology Princeton University, USA

6.4.7 Przeciwciała królicze, rekombinowane, anty-PP1 $\alpha$ , Abcam

6.4.8 Przeciwciała kozie anty-mysie sprzężone z fikoerytryną (PE), Becton Dickinson

6.4.9 Przeciwciała kozie anty-królicze, sprzężone z HRP, Jackson ImmunoResearch Laboratories

6.4.10 Przeciwciała kozie anty-mysie, sprzężone z HRP, Jackson ImmunoResearch Laboratories

6.4.11 Przeciwciała kozie anty-królicze sprzężone z Alexa Fluor 488, Molecular Probes

6.4.12 Przeciwciała kozie anty-mysie sprzężone z Alexa Fluor 546, Molecular Probes

## 6.5 Szczepy bakteryjne

### 6.5.1 *Escherichia coli* TOP TEN, Life Technologies, Invitrogen

F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1  $\lambda$ -

Komórki bakteryjne o podwyższonej kompetencji, zapewniające wyższą wydajność transformacji.

### 6.5.2 NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency), New England Biolabs

Komórki bakteryjne o podwyższonej kompetencji. Komponent zestawu NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit, New England Biolabs.

## 6.6 Plazmidy

### 6.6.1 pJET1.2/blunt Amp<sup>R</sup>, Thermo Scientific

### 6.6.2 p-LEXY\_I-blecherry 3, Jena Bioscience

### 6.6.3 pEGFP(C1)-PP1alpha Kan<sup>R</sup>

Wektor plazmidowy niosący gen kodujący katalityczną podjednostkę alfa białkowej fosfatazy 1 (*PPP1CA*) w fuzji z GFP, pod kontrolą promotora CMV, zapewniającego ekspresję genu w komórkach ssaczych. Otrzymany z MSI/WTB Complex, University of Dundee, Szkocja, za pośrednictwem Addgene.

### 6.6.4 pFASTBacDual gE-GFP Amp<sup>R</sup>, Gent<sup>R</sup>

Wektor niosący gen kodujący glikoproteinę gE w fuzji z GFP pod kontrolą promotora CMV (ekspresja w komórkach ssaczych). Plazmid pochodzi z kolekcji Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów MWB UG-GUMed i został skonstruowany przez dr Agnieszkę Brzozowską.

### 6.6.5 pEGFP-C1 Kan<sup>R</sup>

Wektor plazmidowy niosący gen kodujący GFP pod kontrolą promotora CMV, Clontech Laboratories Inc.

## 6.7 Startery do reakcji PCR

Startery do reakcji PCR zostały zsyntetyzowane w firmie Genomed.

## 6.8 Podłoża do hodowli komórek bakteryjnych

### 6.8.1 Podłoże LA (bulion lizogeny z agarą, z ang. *lysogeny broth agar*)

Skład: pepton bakteriologiczny -10 g, ekstrakt drożdżowy – 5 g, NaCl – 10 g, agar – 15 g.

Składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej, dopełniono wodą do objętości 1000 ml, a następnie doprowadzono do pH=7,2.

Całość jałowiono w autoklawie (1 atm., 121°C). Do podłoża LA dodawano kanamycyny lub ampicyliny w odpowiednich stężeniach w celu selekcji transformantów.

### 6.8.2 Podłoże LB (bulion lizogeny , z ang. *lysogeny broth*)

Skład: pepton bakteriologiczny -10 g, ekstrakt drożdżowy – 5 g, NaCl – 10 g.

Składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej, dopełniono wodą do objętości 1000 ml, a następnie doprowadzono do pH=7,2.

Całość jałowiono w autoklawie (1 atm., 121°C). Do podłoża LB dodawano kanamycyny lub ampicyliny w odpowiednich stężeniach w celu selekcji transformantów.

## 6.9 Antybiotyki

6.9.1 Ampicylina, Sigma-Aldrich, stężenie końcowe 100 µg/ml

6.9.2 Kanamycyna, Sigma-Aldrich, stężenie końcowe 50 µg/ml

6.9.3 Gentamycyna, Sigma -Aldrich, stężenie końcowe 50 µg/ml

6.9.4 Roztwór antybiotyków AA (z ang. *Antibiotic/Antimycotic*), 100 x, Sigma-Aldrich

Skład: 10000 U/ml penicyliny, 1000µg/ml streptomycyny, 25 µg/ml amfoterycyny B

## **6.10 Enzymy**

BshTI (AgeI), Thermo Fisher Scientific

Eco32I (EcoRV), Thermo Fisher Scientific

Mph1103I (NsiI), Thermo Fisher Scientific

NdeI, Thermo Fisher Scientific

VspI (AseI), Thermo Fisher Scientific

XbaI, Thermo Fisher Scientific

Ligaza DNA T4, Thermo Fisher Scientific

KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit, Roche

Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs

## **6.11 Wzorce masowe**

### **6.11.1 Wzorzec masowy do elektroforezy agarozowej GeneRuler™ DNA Ladder Mix 100-10000 kb, Life Technologies**

Fragmenty DNA o wielkości: 10000 pz, 8000 pz, 6000 pz, 5000 pz, 4000 pz, 3500 pz, 3000 pz, 2500 pz, 2000 pz, 1500 pz, 1200 pz, 1031 pz, 900 pz, 800 pz, 700 pz, 600 pz, 500 pz, 400 pz, 300 pz, 200 pz, 100 pz.

### **6.11.2 Wzorzec masowy do elektroforezy SDS-PAGE PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Life Technologies**

10 białek o masie równej około: 170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa, 10 kDa.

## **6.12 Bufory i roztwory**

### **6.12.1 Bufor PBS (z ang. *Phosphate Buffered Saline*) – roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami**

Skład: 137 mM NaCl + 15 mM KCl + 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4.

### **6.12.2 Roztwór metylocelulozy 1% w medium**

Skład: Metyloceluloza – 4 g, DMEM 10x – 40 ml, FBS – 25 ml, NaHCO<sub>4</sub> – 12 ml, AA – 2,8 ml

Metylocelulozę zawieszono w 320 ml H<sub>2</sub>O destylowanej, a następnie jałowiono (0,5 h; 0,7 atm., 121°C). Po czym pozostawiono do rozpuszczenia na mieszadło magnetycznym przez noc w temperaturze 4°C. Następnie dodano pozostałe składniki i ponownie wymieszano na mieszadło.

### **6.12.3 Bufor do inaktywacji wirusa zewnątrzkomórkowego**

Skład: 10 mM KCl + 135 mM NaCl + 40 mM CH<sub>3</sub>COONa, pH 3,0.

### **6.12.4 Bufor PBA**

Skład: 1% BSA + 0,02% azydek sodu + PBS 1x

### **6.12.5 Bufor TE (z ang. *Tris + EDTA*)**

Skład: 1mM EDTA + 10mM Tris-HCl; pH 7,5.

### **6.12.6 Bufor TAE (z ang. *Tris + Acetate + EDTA*)**

Skład: 10 mM EDTA + 40 mM Tris-octan; pH 8,3.

### **6.12.7 Bufor obciążający do próbek DNA 6x stężony**

Skład: 40% sacharoza + 200 mM EDTA + 0,25% błękit bromofenolowy.

### **6.12.8 2M CaCl<sub>2</sub>**

Roztwór jałowiono przez sączenie przy użyciu filtra strzykawkowego 0,22 μm.

### **6.12.9 Bufor HBS (z ang. *HEPES Buffered Saline*) 2x stężony – roztwór soli fizjologicznej buforowany HEPES**

Skład: 1,63% NaCl + 1,2% HEPES + 0,2% glukoza + 0,0027% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, pH=7,5 doprowadzono 0,5N NaOH. Roztwór jałowiono przez sączenie przy użyciu filtra strzykawkowego 0,22 μm.

**6.12.10 Roztwór 15% glicerolu w HBS do szoku glicerynowego**

Roztwór jałowiono przez sączenie przy użyciu filtra strzykawkowego 0,22  $\mu\text{m}$ .

**6.12.11 Bufor do lizy z CHAPS (3-((3-cholamidopropylodimetyloamonio)-1-propanosulfonian)**

Skład: 1% CHAPS + 0,5 mM EDTA+ 150 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH=7,5

**6.12.12 Bufor do lizy z digitoniną**

Skład: 25  $\mu\text{g/ml}$  digitonina + 50 mM HEPES + 150 mM NaCl, pH=7,4

**6.12.13 Bufor do lizy z Triton X-100**

Skład: 1% Triton X-100, 0,5 mM EDTA+ 150 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH=7,5

**6.12.14 Bufor płuczący**

Skład: 10 mM Tris-HCl pH =7,5 + 150 mM NaCl + 0,5 mM EDTA

**6.12.15 Bufor obciążająco-lizujący do elektroforezy poliakrylamidowej 2x stężony**

Skład: 120 mM Tris-HCl pH=6,8 + 20 % glicerol + 4 % SDS + 0,04 % błękit bromofenolowy + 10 %  $\beta$ -merkaptoetanol

**6.12.16 Bufor SDS-PAGE 1x**

Skład: 25 mM Tris + 192 mM glicyna + 0,1% SDS, pH 8.3

**6.12.17 Roztwór utrwalający żele poliakrylamidowe przed barwieniem Coomassie Brilliant Blue G250**

Skład: 40% etanol + 10% lodowaty kwas octowy

**6.12.18 Roztwór Coomassie Brilliant Blue G-250 do barwienia białek w żelach poliakrylamidowych**

Skład: 0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250, 45% etanol, 10% lodowaty kwas octowy

**6.12.19 Roztwór odbarwiający**

Skład: 20% etanol + 10% lodowaty kwas octowy

**6.12.20 Bufor do transferu półsuchego białek z żelu poliakrylamidowego na błonę**

Skład: 48 mM Tris + 39 mM glicyna + 0,0375% SDS + 20% methanol

### **6.12.21 Bufor TBS-T (z ang. *Tris Buffered Saline with Tween 20*)**

Skład: 25mM Tris-HCl pH=7,5 + 0,5M NaCl + 0,1% Tween 20

## **6.13 Odczynniki chemiczne**

- 6.13.1** Trypsyna, Life Technologies
- 6.13.2** Metyloceluloza, Sigma-Aldrich
- 6.13.3** Tween 20, POCH
- 6.13.4** FBS, GIBCO
- 6.13.5** Triton X-100, POCH
- 6.13.6** ProLong Diamond Antifade Mountant, Life Technologies
- 6.13.7** DMSO, Sigma-Aldrich
- 6.13.8** Agaroza, Prona
- 6.13.9** Simply Safe, EURX
- 6.13.10** Błękit bromofenolowy, POCh
- 6.13.11** HEPES, Sigma-Aldrich
- 6.13.12** MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X), GIBCO
- 6.13.13** Tris, Sigma-Aldrich
- 6.13.14** EDTA, Sigma-Aldrich
- 6.13.15** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Serva
- 6.13.16** Glicerol, Sigma-Aldrich
- 6.13.17** CaCl<sub>2</sub>, POCH
- 6.13.18** KCl, Sigma-Aldrich
- 6.13.19** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Serva
- 6.13.20** Roztwór inhibitorów proteaz, Roche
- 6.13.21** Kulki magnetyczne, Binding Control Magnetic Agarose Beads, Chromotek
- 6.13.22** Akrylamid i bis-akrylamid 29:1, Serva
- 6.13.23** SDS, Sigma-Aldrich
- 6.13.24** β-merkptoetanol, POCh
- 6.13.25** Nadsiarczan amonu – APS, Sigma-Aldrich
- 6.13.26** TEMED, Roche
- 6.13.27** Metanol, POCh



- 6.13.28 Glicyna, Sigma-Aldrich
- 6.13.29 Sacharoza, Research Organics
- 6.13.30 Glukoza, Polfa
- 6.13.31 Roztwory wywoływacza i utrwalcza RTG, Kodak
- 6.13.32 NaCl, POCH
- 6.13.33 L-leucyna, Sigma-Aldrich
- 6.13.34 L-lizyna, Sigma-Aldrich
- 6.13.35 L-arginina, Sigma-Aldrich
- 6.13.36  $^{13}\text{C} \ ^{15}\text{N}$  L-Lysine ( $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -L-lizyna), Silantes
- 6.13.37  $^{13}\text{C} \ ^{15}\text{N}$  L-Arginine ( $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -L-arginina), Silanes
- 6.13.38 2H 4, 4', 5, 5'-D4-L-Lysine ( $^2\text{H}_4$ -lizyna), Silanes
- 6.13.39  $^{13}\text{C}$  L-Arginine  $^{13}\text{C}_6$ -arginina, Silantes
- 6.13.40 AlamarBlue®, Bio-Rad
- 6.13.41 Fluorek fenylometanosulfonylu (PMSF), Sigma-Aldrich
- 6.13.42 Leupeptyna, Sigma-Aldrich
- 6.13.43 Aprotynina, Sigma-Aldrich
- 6.13.44 Kalikulina A, Sigma-Aldrich
- 6.13.45 Ortowanadan sodu ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), Sigma-Aldrich
- 6.13.46 Fluorek sodu (NaF), Sigma-Aldrich
- 6.13.47 Trypsyna, Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega

Pozostałe odczynniki pochodzą z firmy Polskie Odczynniki Chemiczne.

## 6.14 Zestawy komercyjne

- 6.14.1 Zestaw do barwienia w teście IPMA, VECTOR NovaRED Peroxidase Substrate Kit, VECTOR LABORATORIES
- 6.14.2 Zestaw do izolacji DNA wirusowego, Virus Mini AX Transfect, A&A Biotechnology,
- 6.14.3 Zestaw do izolacji DNA z żeli agarozowych, Gel Out Concentrator, A&A Biotechnology
- 6.14.4 Zestaw do klonowania produktów PCR, CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific
- 6.14.5 Zestaw do izolacji DNA plazmidowego, Plasmid Mini, A&A Biotechnology,

**6.14.6** Zestaw do koimmunoprecypitacji białek, GFP-TRAP® Magnetic Agarose Kit, Chromotek

**6.14.7** Zestaw do koimmunoprecypitacji białek, RFP-Trap® Magnetic Agarose Kit, Chromotek

**6.14.8** Substraty do chemiluminescencji

6.14.8.1 Westar SUN, Cyanagen

6.14.8.2 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific

**6.14.9** Zestaw do transfekcji komórek ssaczych, jetPRIME®, Polyplus,

**6.14.10** Zestaw do klonowania NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit, New England Biolabs

**6.14.11** Zestaw do badania oddziaływań białkowych, F2H Assay Kit, Chromotek

## **6.15 Aparatura specjalistyczna**

Obserwacje mikroskopowe przeprowadzono przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego Leica TSC SP8X lub fluorescencyjnego mikroskopu Nikon Eclipse TE300.

Ultrawierowanie prowadzono w ultrawirówce Beckman Optima z użyciem rotora uchylnego Beckman SW28.

Spektrometrię masową przeprowadzono przy użyciu spektrometru masowego LTQ Orbitrap Velos hybrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

## **6.16 Dodatkowe materiały**

**6.16.1** Naczynia plastikowe do hodowli komórkowych – płytki wielodołkowe, probówki wirownicze, butelki, szalki - BD Falcon™.

**6.16.2** Płytki do obserwacji przyżyciowych ze szklanym dnem,  $\mu$ -Slide 2 Well Glass Bottom, ibidi GmbH, Niemcy

**6.16.3** Płytki do obserwacji przyżyciowych ze szklanym dnem, Willco Wells

**6.16.4** Gotowe gradientowe żele poliakrylamidowe 4-20%, Bio-Rad

**6.16.5** Błona PVDF, Immobilon, Sigma-Aldrich

**6.16.6** Bibuła Whatman, Sigma-Aldrich

**6.16.7** Klisza światłoczuła, Fugi Medical X-Ray Film

**6.16.8** Statyw magnetyczny 16-Tube SureBeads™ Magnetic Rack, Bio-Rad

## 7. Metody

### 7.1 Hodowle komórek ssaczyc

Komórki ssacze hodowano w odpowiednio suplementowanych pożywkach hodowlanych (**Tab. 4**) w naczyniach polistyrenowych (butelkach i płytkach wielodołkowych), przeznaczonych do hodowli jednowarstwowych (**Materiały 6.16.1**). Po uzyskaniu określonego stopnia konfluencji, hodowle płukano dwukrotnie buforem PBS (**Materiały 6.12.1**) a następnie dodawano roztworu trypsyny (**Materiały 6.13.1**). Po upływie odpowiedniego czasu do oderwania komórek od powierzchni naczynia, roztwór trypsyny neutralizowano jedną objętością podłoża hodowlanego. Następnie komórki zliczano w hemocytometrze i zawieszano w odpowiedniej ilości pożywki hodowlanej. Hodowle prowadzono w inkubatorach w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C.

**Tab. 4: Podłoża stosowane do hodowli komórek ssaczyc.**

Linia komórkowa	Podłoże hodowlane
MDBK (Materiały 6.1.1)	RPMI (Materiały 6.2.1 i 6.2.2)
KOP-R (Materiały 6.1.2)	HMEM (Materiały 6.2.3), EMEM (Materiały 6.2.4)
Fibroblasty bydlęce (Materiały 6.1.3)	DMEM (Materiały 6.2.5)
F2H®-BHK (Materiały 6.1.4)	DMEM (Materiały 6.2.5)

### 7.2 Infekcja komórek ssaczyc wirusem BHV-1

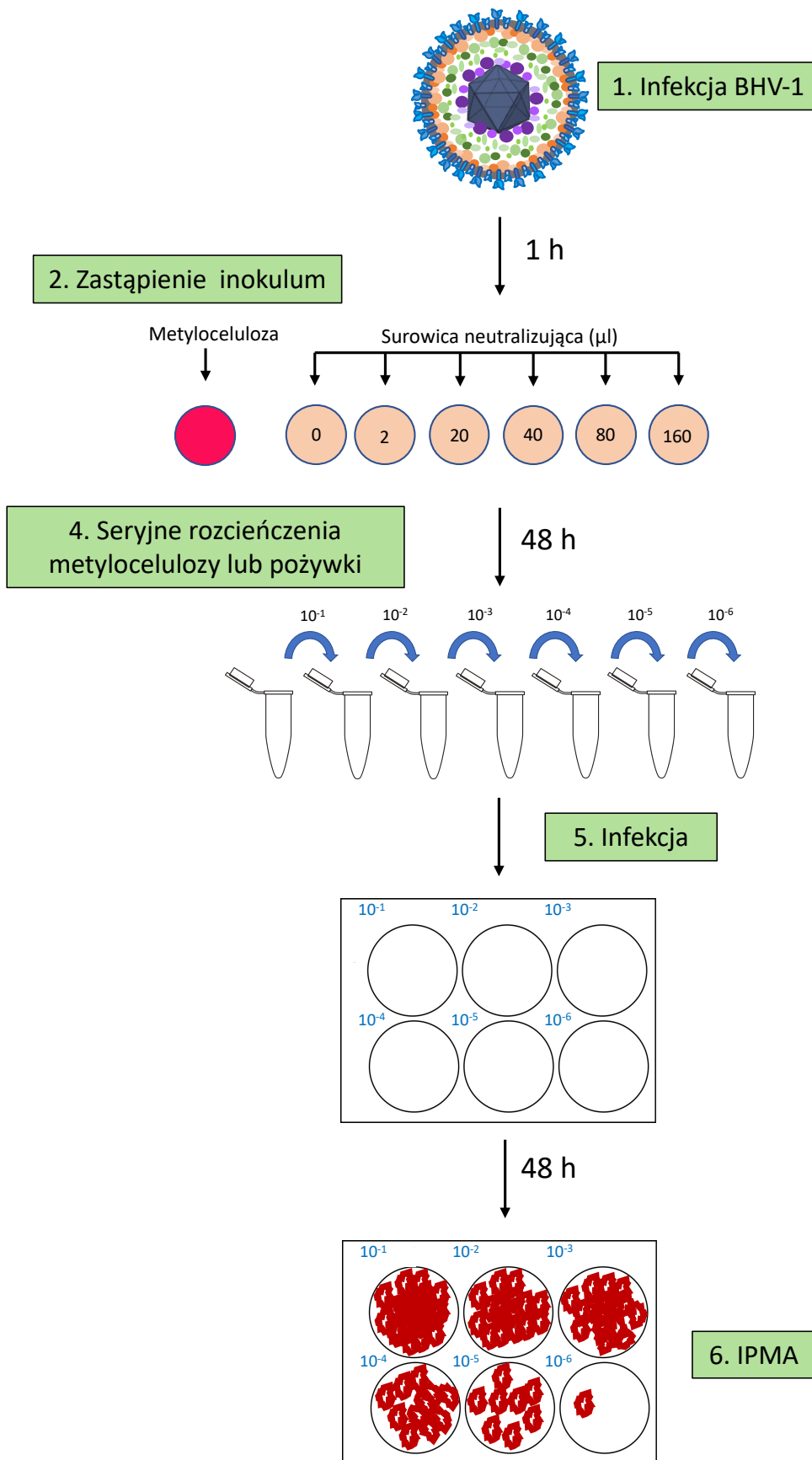
Po uzyskaniu ok. 80% poziomu konfluencji w hodowli komórek ssaczyc, pożywkę zbierano i zastępowano podłożem zawierającym wirusa, w minimalnej objętości, wystarczającej do pokrycia powierzchni naczynia. Następnie hodowlę inkubowano przez 1 h w atmosferze, 5% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C. Po upływie tego czasu, inokulum zastępowano odpowiednią ilością świeżego podłoża wzrostowego. Po uzyskaniu całkowitego efektu cytopatycznego, lizat wirusowy zbierano, odwirowywano (4000 rpm, 5 min) i porcjowano po 500 µl – 1000 µl. Porcje lizatu przechowywano do dalszych analiz w temp. -70°C.

### 7.3 Miareczkowanie wirusa

W celu oznaczenia miana wirusa lub uzyskania pojedynczych łyseinek wirusowych, wykonywano seryjne rozcieńczenia dziesiętne lizatu wirusowego. Następnie rozcieńczenia nanoszono na hodowlę jednowarstwową komórek ssaczy w studzienkach płytek 6- lub 12-dołkowych, w objętości odpowiednio 600  $\mu$ l lub 350  $\mu$ l. Po 1 h inkubacji w atmosferze, 5% CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C, inokulum zbierano a komórki przykrywano 1% roztworem metylocelulozy (**Materiały 6.12.2**) lub podłożem wzrostowym zawierającym surowicę neutralizującą wirusa zewnątrzkomórkowego (**Materiały 6.4.1**). Po 48-72 h inkubacji, zliczano łyseinki wirusowe dla określenia miana wirusa lub barwiono przy pomocy testu IPMA (**Metody 7.5**) dla pomiaru wielkości pojedynczych łyseinek wirusowych (**Metody 7.6**).

### 7.4 Test neutralizacji wirusa zewnątrzkomórkowego

Komórki linii bydlęcych (**Materiały 6.1.1 oraz 6.1.3**) hodowano w płytkach dwunastołkowych do 80% stopnia konfluencji. Następnie, komórki infekowano wirusem BHV-1 WT (**Materiały 6.3.1**) w ilości 50 PFU/ml. Po 1 h inkubacji, inokulum zbierano i zastępowano roztworem 1% metylocelulozy (**Materiały 6.12.2**), odpowiednią do typu komórek czystą pożywką hodowlaną lub podłożem zawierającym 2, 20, 40, 80 lub 160  $\mu$ l surowicy neutralizującej BHV-1 (**Materiały 6.4.1**). Po 48 h inkubacji w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C, zbierano metylocelulozę lub podłoże, wykonywano seryjne rozcieńczenia dziesiętne i dodawano do świeżej hodowli jednowarstwowej komórek bydlęcych. Po 1 h inkubacji, rozcieńczenia zbierano, a komórki przykrywano 1% roztworem metylocelulozy. Po kolejnych 48 godzinach inkubacji komórki barwiono przy użyciu testu IPMA, w celu wizualizacji łyseinek wirusowych (**Metody 7.5**). Następnie łyseinki zliczano, by określić optymalną ilość surowicy neutralizującej wirusa zewnątrzkomórkowego (**Ryc. 20**). Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych.



**Ryc. 20: Schemat przeprowadzenia testu neutralizacji zewnątrzkomórkowego BHV-1. W ramkach oznaczono kolejne etapy procedury.**

## 7.5 Test immunodetekcji białek *in situ* (IPMA)

Test IPMA (z ang. *Immunoperoxidase monolayer assay*) przeprowadzano w celu detekcji białek wirusowych w hodowlach jednowarstwowych komórek ssaczy. Komórki infekowane wirusem BHV-1 WT (**Materiały 6.3.1**) lub rekombinantami wirusowymi (**Materiały 6.3.2-6.3.7**) płukano trzykrotnie buforem PBS (**Materiały 6.12.1**), po czym suszono i zamrażano w temp. -20°C. W kolejnym etapie procedury komórki utrwalano 4% roztworem zimnego paraformaldehydu w buforze PBS przez 10 min. Po upływie tego czasu komórki płukano trzykrotnie buforem PBS z dodatkiem 0,5% Tween 20 (**Materiały 6.13.3**), a następnie dodawano roztworu przeciwciał pierwszorzędowych w buforze PBS z Tween 20 i 5% FBS (**Materiały 6.13.4**). Inkubację z roztworem przeciwciał prowadzono przez 1 h w temp. pokojowej, na kołysce laboratoryjnej. W celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał, utrwalone komórki płukano trzykrotnie buforem PBS z 0,5% Tween 20. Następnie prowadzono 1h inkubację z koniugatem przeciwciał gatunkowo specyficznych sprzężonych z peroksydazą chrzanową (z ang. *horseradish peroxidase*, HRP) w buforze PBS z 1% Tween 20 i 5% FBS. Detekcję kompleksów przeciwciał prowadzono przy użyciu zestawu VECTOR NovaRED Peroxidase Substrate Kit (**Materiały 6.14.1**)

## 7.6 Pomiar wielkości łysinek

Łysinki wirusowe wybarwiano przy użyciu testu IPMA (**Metody 7.5**). Następnie studzienki płytki wielodołkowej, zawierające odpowiednią ilość łysinek, skanowano z rozdzielczością 1200 dpi. Powierzchnię pojedynczych łysinek określano w jednostkach arbitralnych za pomocą oprogramowania LUCIA Image, Laboratory Imaging. Wielkość łysinek mutantów wirusowych została określona jako średnia z pomiaru 150 łysinek.

## 7.7 Mikroskopowa analiza przyżyciowa rekombinantów BHV-1

W celu przeprowadzenia mikroskopowych obserwacji przyżyciowych, komórki linii bydlęcych (**Materiały 6.1.1-6.1.3**) hodowano w płytkach  $\mu$ -Slide 2 Well Glass Bottom, ibidi GmbH (**Materiały 6.16.5**) lub Willco Wells (**Materiały 6.16.6**), do osiągnięcia odpowiedniego do eksperymentu stopnia konfluencji. Następnie komórki infekowano fluorescencyjnymi rekombinantami BHV-1. Po 1 h inkubacji w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C, zbierano inokulum i zastępowano 1% roztworem metylocelulozy

**(Materiały 6.12.2)** lub podłożem wzrostowym zawierającym surowicę neutralizującą BHV-1 **(Materiały 6.4.1)**. Obserwacje prowadzono w komorze przyżyciowej w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym Leica TCS SP8 X **(Materiały 6.15)** z zastosowaniem obiektywu o powiększeniu 63x. Obraz zbierano co 10-12 s, przez 12 h, przy odpowiedniej długości fali wzbudzenia - 475 nm dla GFP oraz 587 nm dla mCherry. Obrazy zostały przetworzone do filmów poklatkowych, opatrzonych skalą i znacznikiem czasu, przy użyciu oprogramowania Leica Software LasX.

W celu określenia prędkości procesu CTC, obserwacje prowadzono od momentu pojawienia się sygnału fluorescencyjnego wirusowych białek fuzyjnych (gE-GFP oraz gETM<sup>-</sup>-GFP). Prędkość CTC została określona jako ilość komórek infekowanych w środowisku surowicy neutralizującej wirusa lub roztworu 1% metylocelulozy na 1 h. Średnia prędkość CTC została obliczona na podstawie zliczania komórek dających początek 20 tysinkom wirusowym z ustalonych w programie Leica Software LasX pozycji na preparacie. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych. Do analizy statystycznej wykorzystano test U Manna-Whitneya, na poziomie istotności równym p=0,1. Test przeprowadzono za pomocą bezpłatnego narzędzia Mann-Whitney U Test Calculator, dostępnego pod adresem <http://www.socscistatistics.com>.

## 7.8 Cytometria przepływowa

Komórki MDBK wysiewano w ilości 3 x 10<sup>5</sup> na szalki o średnicy 6 cm **(Materiały 6.16.1)**. Następnego dnia komórki infekowano wirusem BHV-1 WT **(Materiały 6.1.1)**, BHV-1 gETM<sup>-</sup> **(Materiały 6.3.3)**, BHV-1 ΔUS3 **(Materiały 6.3.5)** oraz BHV-1 US3 KD **(Materiały 6.3.6)** w MOI=1. Kontrolą w eksperymencie były komórki nieinfekowane. W określonych odstępach czasowych od infekcji (6, 12, 24 hpi), komórki traktowano trypsyną, przenoszono do probówek wirowniczych i wirowano z prędkością 800 rpm przez 5 min, w temp. +4°C. Następnie komórki płukano jednokrotnie buforem PBS, wirowano i płukano buforem PBA **(Materiały 6.12.4)**. Po kolejnym wirowaniu komórki zawieszano w 300 μl buforu PBA i przenoszono po 100 μl na studzienkę płytki 96-dołkowej. Po kolejnym wirowaniu (1200 rpm, 3 min, +4°C) komórki inkubowano w roztworze przeciwciał anti-gE/gI **(Materiały 6.4.3)** w buforze PBA, przez 1 h. W kolejnym etapie komórki płukano trzykrotnie buforem PBA i inkubowano w roztworze przeciwciał drugorzędowych



gatunkowo specyficznych, sprzężonych z PE (**Materiały 6.4.9**) przez 45 min. Następnie komórki płukano trzykrotnie w buforze PBA, przenoszono do 1,5 ml probówek i analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACS Calibur, Becton Dickinson (**Materiały 6.15**), w programie CellQuest Pro i cytometru Merck/Guava easyCyte, Merck (**Materiały 6.15**), w programie InCyte. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych.

## 7.9 Immunofluorescencja

Hodowle komórek ssaczych prowadzono w płytkach 12-dołkowych, z umieszczonymi na dnach studzienek szkiełkami nakrywkowymi. Następnie komórki infekowano rekombinantami wirusa BHV-1. Po odpowiednim czasie od infekcji komórki płukano buforem PBS (**Materiały 6.12.1**), po czym utrwalano w 4% roztworze zimnego paraformaldehydu w buforze PBS, przez 10 min. W kolejnym etapie, komórki permeabilizowano roztworem 0,2 % Triton X-100 (**Materiały 6.13.5**) w PBS, przez 5 min. Po permeabilizacji, komórki płukano trzykrotnie buforem PBS i dodawano roztworu przeciwciał pierwszorzędowych (**Tab. 5**) w buforze PBS z dodatkiem 5% FBS (**Materiały 6.13.4**). Inkubację w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych prowadzono przez 1 h w temperaturze pokojowej na kołyszce laboratoryjnej. Po usunięciu przeciwciał oraz trzykrotnym płukaniu buforem PBS, do komórek dodawano roztworu przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z fluorochromem i ponownie inkubowano przez 1 h. Po kolejnej serii płukania w buforze PBS, preparaty mikroskopowe zamykano za pomocą ProLong Diamond Antifade Mountant DAPI, Life Technologies (**Materiały 6.13.6**). Analizę mikroskopową prowadzono we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym Leica TSC SP8X (**Materiały 6.15**).

**Tab. 5: Przeciwciała użyte do immunofluorescencji.**

Przeciwciała	Stężenie	Znacznik
Anty-gE/gI (Materiały 6.4.3)	1:2000	-----
Anty- $\beta$ -katenina (Materiały 6.4.4)	1:1000	-----
Anty-PP1 $\alpha$ (Materiały 6.4.7)	1:300	-----
Anty-mysie (Materiały 6.4.11)	1:1000	Alexa Fluor 546
Anty-królicze (Materiały 6.4.12)	1:1000	Alexa Fluor 488

## 7.10 Izolacja DNA wirusowego

Komórki ssące hodowano w trzech butelkach o powierzchni 125 cm<sup>2</sup> do uzyskania 80% poziomu konfluencji. Następnie hodowlę infekowano wirusem i inkubowano w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C do uzyskania efektu cytopatycznego. Pożywkę zawierającą wirusa zbierano do probówek wirowniczych o pojemności 50 ml, po czym wirowano z prędkością 4000 rpm przez 5 minut, w celu osadzenia resztek komórkowych. Uzyskany supernatant wirowano w ultrawirówce z rotorem Beckam SW28 (**Materiały 6.15**) przez 3 godziny w +4°C z prędkością 28000 rpm. Osadzone wiriony zawieszano w 900 µl buforu TE pH7,4 (**Materiały 6.12.5**). DNA wirusowy izolowano przy użyciu zestawu Virus Mini AX Transfect, A&A Biotechnology (**Materiały 16.14.2**), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta.

## 7.11 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Amplifikację fragmentów DNA przeprowadzono metodą PCR przy użyciu mieszaniny KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit, Roche (**Materiały 6.10**), 5% DMSO (**Materiały 6.13.7**) oraz specyficznych starterów (**Tab. 6**). Czas trwania, ilość cykli oraz profil temperaturowy reakcji został dobrany na podstawie temperatury topnienia starterów.

**Tab. 6: Startery do reakcji PCR.** Na czerwono i zielono zaznaczono sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne. T<sub>m</sub> – (z ang. *melting temperature*) temperatura topnienia.

Starter	Sekwencja (5'→3')	Enzym	T <sub>m</sub>
36-FOR	ATTATAGAATTCTCTGCGCTGTCGGGCCTTGGCTC		72°C
35-REV	TTATACCATGCATACCGGTGCCGGGATCGACCGAT	NsiI+AgeI	74°C
35-FOR	ATTATAGCATGCATGGCGTCGTCGAACCGCGAGTG	NsiI	74°C
34-REV	ATTATAGGATCCTTTGGCCTTTTCGGCGCGCCTGG		74°C
Cherry-FOR	CACCATGCATAGCAAGGGCGAGGAGGATAAC	NsiI	70°C
Cherry-REV	ATTACCGGTCTTGACAGCTCGTCCATGCC	AgeI	70°C

## 7.12 Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie DNA przeprowadzono w firmie Genomed z użyciem starterów pJET1.2 Forward Sequencing Primer oraz pJET1.2 Reverse Sequencing Primer, będących komponentami zestawu CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific (**Materiały 6.14.4**).

### 7.13 Elektroforeza agarozowa

Przygotowanie żelu agarozowego oraz rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w oparciu o protokół wg Sambrook i Russell, 2001 [433]. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w 1% żelu agarozowym w buforze TAE (**Materiały 6.12.6**). Odpowiednią ilość agarozy (**Materiały 6.13.8**) rozpuszczano w 1x stężonym buforze TAE poprzez podgrzanie do wrzenia w kuchence mikrofalowej, do uzyskania klarownego roztworu. Po schłodzeniu do temperatury ok. 50°C, do agarozy dodawano barwnika Simply Safe (**Materiały 6.13.9**) w ilości 5 µl/100 ml żelu, a następnie żel wylewano na płytkę aparatu do elektroforezy. Do próbek DNA dodawano bufor obciążający (**Materiały 6.12.7**), po czym nanoszono je do studzienek żelu. By określić wielkość rozdzielanych elektroforetycznie fragmentów DNA stosowano wzorzec masowy GeneRuler™ DNA Ladder Mix 100-10000 kb, Life Technologies (**Materiały 6.11.1**). Elektroforezę prowadzono przy napięciu prądu odpowiadającym 1-5 V na 1 cm długości żelu. W celu uwidocznienia fragmentów DNA, żel naświetlano światłem ultrafioletowym o długości fali 312 nm.

### 7.14 Izolacja DNA z żelu agarozowego

Izolację DNA z żelu agarozowego przeprowadzono przy pomocy zestawu Gel Out Concentrator, A&A Biotechnology (**Materiały 6.14.3**), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

### 7.15 Ligacja DNA

Ligację produktów PCR do wektora pJET1.2/blunt przeprowadzono zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta zestawu CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific (**Materiały 6.14.4**).

Ligację wstawek z „lepkimi” końcami do plazmidów przeprowadzono w oparciu o protokół zawarty w Sambrook i Russell, 2001 [433].

### 7.16 Przygotowanie komórek kompetentnych

Przygotowanie komórek kompetentnych *Escherichia coli* TOP 10 (**Materiały 6.5.1**) do transformacji metodą chlorkową przeprowadzono w oparciu o protokół wg Sambrook i Russell, 2001 [433]. Pojedynczą kolonią bakteryjną zaszczepiono 10 ml podłoża

wzrostowego LB (**Materiały 6.8.2**), a następnie inkubowano w wytrząsarce powietrznej, w temp. 37°C przez noc. Następnego dnia hodowlę nocną odmładzano w stosunku 1:50, dodając 0,5 ml hodowli nocnej do 25 ml podłoża LB. Hodowlę inkubowano w wytrząsarce do uzyskania  $OD_{575}=0,4-0,6$ , po czym schładzano w lodzie 10 min i wirowano 15 min z prędkością 4000 rpm w temp. +4°C. Osad zawieszano w 10 ml zimnego 0,1 M  $CaCl_2$  i inkubowano w lodzie przez 30 min. Zawiesinę bakterii ponownie wirowano, osad zawieszano w 4 ml zimnego 0,1M  $CaCl_2$  z 5% glicerolem. Następnie komórki kompetentne porcjowano po 200  $\mu$ l do probówek typu Eppendorf i zamrażano w temperaturze -70°C.

### 7.17 Transformacja komórek bakteryjnych DNA plazmidowym

Transformację komórek kompetentnych *Escherichia coli* TOP10 (**Materiały 6.5.1**) przeprowadzono metodą chlorkową w oparciu o protokół wg Sambrook i Russell, 2001 [433]. Do 100  $\mu$ l komórek kompetentnych *Escherichia coli* TOP10 dodano DNA plazmidowy (50 ng) lub mieszaninę ligacyjną i inkubowano w lodzie przez 30 min. Po inkubacji, komórki poddano szokowi termicznemu przez 90 s w temp. 42,5°C, po czym przenoszono do łaźni lodowej. Następnie, dodawano do komórek 1 ml podłoża LB (**Materiały 6.8.2**). Całość inkubowano w wytrząsarce powietrznej przez 60 min w temp. 37°C. Zawiesinę bakterii w porcjach po 100  $\mu$ l wysiewano na podłoże selekcyjne LA (**Materiały 6.8.1**) zawierające odpowiedni antybiotyk (**Materiały 6.9**).

Transformację komórek kompetentnych NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency), New England Biolabs (**Materiały 6.5.2**) przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta.

### 7.18 Izolacja DNA plazmidowego z bakterii

Izolację DNA plazmidowego przeprowadzono przy pomocy zestawu Plasmid Mini, A&A Biotechnology (**Materiały 6.14.5**), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

### 7.19 Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

W celu przygotowania lepkich bądź tępych końców do klonowania lub analizy restrykcyjnej produktu ligacji, przeprowadzono trawienie endonukleazami restrykcyjnymi. Reakcja prowadzona była w temperaturze 37°C przez 1h lub przez noc,

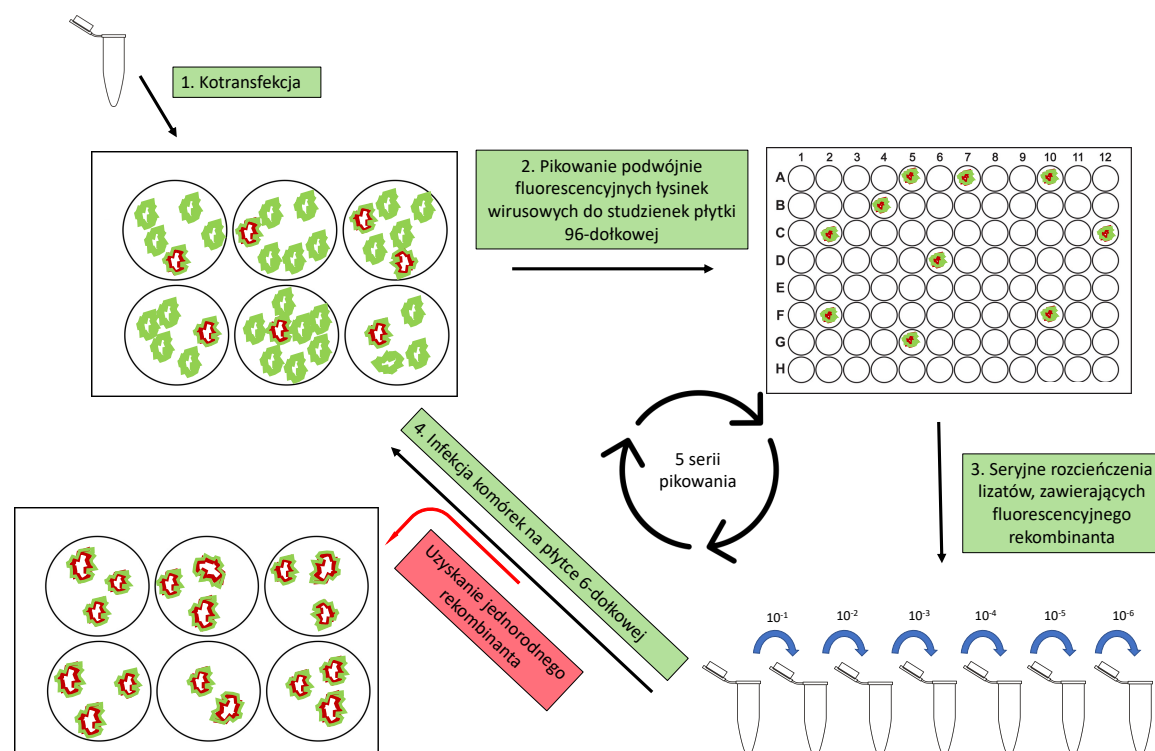
w zależności od ilości trawionego DNA. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano DNA w ilości od 50 ng do 20 µg, 1-2U enzymu/enzymów na 1 µg DNA, bufor 10x stężony oraz wodę wolną od nukleaz. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła od 20 µl dla analizy restrykcyjnej produktów ligacji do 100 µl w przypadku trawienia DNA kasety do kotransfekcji (**Metody 7.20**).

## **7.20 Kotransfekcja DNA wirusowego i kasety do kotransfekcji**

Kotransfekcję DNA wirusowego oraz DNA kasety do kotransfekcji przeprowadzano w komórkach linii KOP-R (**Materiały 6.1.2**), w płytkach 6-dołkowych (**Materiały 6.16.1**). Komórki wysiewano na płytki w ilości  $2 \times 10^5$  komórek na jeden dołek. Po całonocnej inkubacji wymieniano pożywkę z nad komórek na świeżą, a po 3 h do komórek dodawano mieszaninę transfekcyjną. Mieszanina transfekcyjna zawierała precypitat DNA z chlorkiem wapnia. Mieszaninę przygotowano w dwóch probówkach – A i B. W probówce A mieszano 2,5 µg DNA wirusowego, 2,5 µg DNA kasety do kotransfekcji oraz 62,5 µl 2M  $\text{CaCl}_2$  (**Materiały 6.12.8**) w 500 µl  $\text{H}_2\text{O}$ . W probówce B przygotowano 500 µl buforu 2x HBS (**Materiały 6.12.9**). Powoli mieszając dodawano zawartość probówki A do probówki B, a następnie inkubowano przez 20 min w ciemności w temperaturze pokojowej. Powstały precypitat dodawano kroplami do pożywki w kolejnych dołkach płytki 6-dołkowej, po czym komórki inkubowano przez 4 h w temperaturze 37°C i atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ . Po inkubacji komórki przemywano pożywką bez FBS. W celu wprowadzenia DNA do komórek, przeprowadzono szok glicerolowy. Na tym etapie zbierano pożywkę i dodawano 15% glicerol w 1x HBS (**Materiały 6.12.10**). Po 2 min inkubacji, komórki płukano dwukrotnie buforem PBS i dodawano 1% roztworu metylocelulozy (**Materiały 6.12.2**). Inkubację prowadzono w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  w temperaturze 37°C, aż do pojawienia się łysinek wirusowych.

## 7.21 Izolacja fluorescencyjnych rekombinantów BHV-1 z fuzją VP26-mCherry

W celu wyodrębnienia rekombinantów z fuzją VP26-mCherry, pojedyncze łysinki wirusowe emitujące czerwoną fluorescencję przepikowywano do hodowli komórek MDBK (**Materiały 6.1.1**) na płytkach 96-dołkowych. Po uzyskaniu efektu cytopatycznego przeprowadzano kolejne, dziesiętne rozcieńczenia lizatu na płytkach 6-dołkowych w celu uzyskania pojedynczych, fluorescencyjnych łysinek wirusowych do kolejnej rundy pikowania. Procedurę pikowania łysinek powtarzano pięciokrotnie, aż do uzyskania lizatu zawierającego jednorodnego rekombinanta wirusowego (**Ryc. 21**).



Ryc. 21: Schemat metody izolacji fluorescencyjnych rekombinantów wirusowych na przykładzie BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry. W prostokątach oznaczono kolejne etapy procedury.

## 7.22 Krzywa wzrostu wirusa (z ang. *one-step growth*)

Hodowle jednowarstwowe komórek linii MDBK (**Materiały 6.1.1**) w płytkach 12-dołkowych infekowano wirusem, w MOI=10. Po 1 h inkubacji, inokulum zbierano a komórki inkubowano 2 min z buforem do inaktywacji wirusa zewnątrzkomórkowego (**Materiały 6.12.3**). Następnie komórki płukano dwa razy buforem PBS (**Materiały 6.12.1**) i dodawano 1ml pożywki. W odpowiednich punktach czasowych po infekcji zbierano

pożywkę z nad komórek i zamrażano w  $-70^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrożeniu miareczkowano wirusa zewnątrzkomórkowego.

### 7.23 Liza komórek ssaczy zainfekowanych rekombinantami BHV-1

Komórki linii bydłych (**Materiały 6.1.1-6.1.3**) hodowano w szalkach o średnicy 10 cm do osiągnięcia 80% stopnia konfluencji. Następnie komórki infekowano fluorescencyjnymi rekombinantami BHV-1 (**Materiały 6.3.2 i 6.3.4**) w  $\text{MOI}=1$ . Po 1 h inkubacji inokulum zbierano i zastępowano świeżą porcją medium hodowlanego. Po 18 h inkubacji w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ , komórki zdrapywano z powierzchni płytki i zawieszano w 200  $\mu\text{l}$  schłodzonego w lodzie buforu do lizy (**Materiały 6.12.11-6.12.13**) z dodatkiem roztworu inhibitorów proteaz (**Materiały 6.13.20**). Lizaty inkubowano w lodzie przez 30 min z intensywnym pipetowaniem co 10 min. Następnie wirowano je z prędkością 17 000 x g przez 10 min, w temp.  $+4^{\circ}\text{C}$ . Do odwirowanych lizatów dodawano 300  $\mu\text{l}$  buforu płuczącego (**Materiały 6.12.14**) z dodatkiem inhibitorów proteaz. Następnie przeprowadzono koimmunoprecypitacje białek wirusowych przy pomocy zestawu GFP-Trap<sup>®</sup>\_MA beads, Chromotek (**Materiały 6.14.6, Metody 7.24**).

### 7.24 Koimmunoprecypitacja

W celu identyfikacji białek oddziałujących z kompleksem gE/gI lub PP1 $\alpha$ , lizaty komórkowe poddawano koimmunoprecypitacji metodą separacji magnetycznej przy użyciu odpowiednio zestawu GFP-Trap<sup>®</sup>\_MA Kit, Chromotek (**Materiały 6.14.6**) lub RFP-Trap<sup>®</sup> Magnetic Agarose Kit, Chromotek (**Materiały 6.14.7**). By zablokować niespecyficzne oddziaływanie białek z kulkami magnetycznymi, do lizatów dodawano 25  $\mu\text{l}$  nieopłaszczonych przeciwciałami kulek magnetycznych Binding Control Magnetic Agarose Beads, Chromotek (**Materiały 6.13.21**). Lizaty inkubowano następnie przez 1 h w temp.  $+4^{\circ}\text{C}$  na rotatorze próbówkowym. Po inkubacji lizaty poddawano separacji magnetycznej na statywie magnetycznym 16-Tube SureBeads<sup>™</sup> Magnetic Rack, Bio-Rad (**Materiały 6.16.7**). Supernatant umieszczono w schłodzonych w lodzie próbkach typu Eppendorf, dodawano do nich kulek magnetycznych GFP-Trap<sup>®</sup> opłaszczonych przeciwciałami anti-GFP lub RFP-Trap<sup>®</sup> opłaszczonych przeciwciałami anti-RFP. Następnie lizaty inkubowano przez 1 h w temp.  $+4^{\circ}\text{C}$ , na rotatorze próbówkowym. Po inkubacji lizaty poddawano

separacji magnetycznej, po czym przeprowadzono trzykrotne płukanie 500 µl buforu płuczącego (**Materiały 6.12.14**). W celu dysocjacji immunokompleksów ze złoża, kulki magnetyczne zawieszano w buforze obciążająco-lizującym do elektroforezy poliakrylamidowej (**Materiały 6.12.15**) i inkubowano przez 10 min w temp. 96°C. Po upływie tego czasu znów przeprowadzano separację magnetyczną. Uzyskany supernatant przechowywano w temp. -20°C do dalszych analiz.

## **7.25 Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)**

Elektroforezę prowadzono w żelach poliakrylamidowych o 15% stężeniu akrylamidu (żel rozdzielający) i 4,5% (żel zagęszczający) lub w żelach gradientowych 4-20% (**Materiały 6.16.4**). Przed naniesieniem do studzienek żelu, próby mieszano z buforem obciążająco-lizującym (**Materiały 6.12.15**) i inkubowano przez 10 min w temp. 96°C. Rozdział prowadzono w buforze SDS-PAGE (**Materiały 6.12.16**). W celu określenia wielkości rozdzielanych białek używano wzorca masowego SDS-PAGE PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Life Technologies (**Materiały 6.11.2**).

Żele barwiono błękitem Coomassie G-250 (**Metody 7.26**) lub przeprowadzono elektrotransfer póluchy białek na błonę PVDF (**Metody 7.27**) i Western Blotting (**Metody 7.28**).

## **7.26 Barwienie żeli poliakrylamidowych**

Po rozdziale elektroforetycznym białek żele utrwalano roztworem utrwalającym (**Materiały 6.12.17**) przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie żele barwiono barwnikiem Coomassie Brilliant Blue G-250 (**Materiały 6.12.18**) przez 20 min w temperaturze pokojowej. Żele odbarwiano roztworem odbarwiającym (**Materiały 6.12.19**) przez 2 h, po czym dwukrotnie płukano H<sub>2</sub>O destylowaną.



## **7.27 Elektrotransfer półsuchy białek z żelu poliakrylamidowego na błonę PVDF**

By przeprowadzić elektrotransfer białek na błonę PVDF składano tzw. „kanapkę” do transferu. W tym celu błonę PVDF (**Materiały 6.16.2**) aktywowano w metanolu (**Materiały 6.13.27**), po czym membranę oraz żel inkubowano w buforze do transferu (**Materiały 6.12.20**) przez 10 min. Po upływie tego czasu cztery bibuły typu Whatmann (**Materiały 6.16.3**) namaczano w buforze do transferu, na nich umieszczano błonę PVDF, następnie żel poliakrylamidowy z rozdzielonymi próbkami białek oraz kolejne cztery warstwy bibuły typu Whatman namoczone w buforze do transferu. Po usunięciu bąbli powietrza, „kanapkę” do transferu umieszczano w aparacie Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Transfer prowadzono przy napięciu 25 V przez 30 min.

## **7.28 Western Blotting**

Po elektrotransferze błonę PVDF blokowano w roztworze 5% mleka odtłuszczonego w buforze TBS-T (**Materiały 6.12.21**) w temp. +4°C przez noc. Następnie membranę inkubowano w roztworze przeciwciał specyficznych wobec analizowanego antygenu w 5% odtłuszczonym mleku w buforze TBS-T. Czas inkubacji, w zależności od użytych przeciwciał, wynosił od 1 h do 16 h. W celu usunięcia niespecyficznie związanych przeciwciał, membranę płukano trzykrotnie buforem TBS-T po 5 min. Następnie inkubowano przez 1 h w roztworze przeciwciał drugorzędowych, gatunkowo specyficznych, sprzężonych z HRP lub AP. Niezwiązany koniugat usuwano przez trzykrotne płukanie błony buforem TBS-T. Detekcję kompleksów antygen-przeciwciała prowadzono przy użyciu substratów do chemiluminescencji - Westar SUN, Cyanagen (**Materiał 6.14.8.1**) lub Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific (**Materiały 6.14.8.2**) poprzez ekspozycję na kliszy światłoczułej (**Materiały 6.16.4**).

## **7.29 Znakowanie izotopowe aminokwasów w pożywce hodowlanej (SILAC)**

Komórki MDBK hodowano w pożywce RPMI 1640, 1780, niezawierającej czerwieni fenolowej, lizyny, leucyny oraz argininy (**Materiały 6.2.2**). Pożywkę suplementowano 10% FBS (**Materiały 6.13.4**), nieznakowanymi aminokwasami („lekkie” piętno) - 382 μM L-

leucyną (**Materiały 6.13.33**), 218  $\mu\text{M}$  L-lysine (**Materiały 6.13.34**), 288  $\mu\text{M}$  L-argininą (**Materiały 6.13.35**) oraz mieszanką antybiotyków AA (**Materiały 6.9.4**). Do znakowania izotopowego w metodzie SILAC, komórki hodowano przez sześć pasaży w podłożu zawierającym aminokwasy znakowane „ciężkim” piętnem -  $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -L-lizynę (**Materiały 6.13.36**),  $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -L-argininę, (**Materiały 6.13.37**) lub „średnim” piętnem -  $^2\text{H}_4$ -lizynę (**Materiały 6.13.38**) i  $^{13}\text{C}_6$ -argininę (**Materiały 6.13.39**). Żywotność komórek hodowanych w pożywce zawierającej „lekkie”, „ciężkie” oraz „średnie” piętno aminokwasów sprawdzano przy pomocy odczynnika AlamarBlue®, Bio-Rad (**Materiały 6.13.40**), wg instrukcji załączonej przez producenta.

### 7.30 Przygotowanie próbek do spektrometrii masowej

Znakowane izotopowo („ciężkie” i „średnie” piętno) lub nieznakowane („lekkie piętno”) komórki MDBK (**Materiały 6.1.1**) hodowano w płytkach o średnicy 10 cm (**Materiały 6.16.1**) do osiągnięcia 80% stopnia konfluencji (ok.  $10^7$  komórek). Następnie komórki infekowano fluorescencyjnymi rekombinantami BHV-1 gE-GFP (**Materiały 6.3.2**) oraz BHV-1 gE-TM<sup>-</sup>-GFP (**Materiały 6.3.4**), w MOI=1. Kontrolą w eksperymencie były komórki nieinfekowane. Po 1 h inkubacji inokulum zbierano i zastępowano porcją medium hodowlanego. Po 18 h inkubacji w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , komórki zdrapywano z powierzchni płytki i poddawano lizie przy pomocy buforu do lizy z CHAPS (**Materiały 6.12.11, Metody 7.23**) z dodatkiem 1mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptyny, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotyniny, 50  $\text{ng}/\text{ml}$  kalikuliny A, 10 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  oraz 10 mM NaF (**Materiały 6.13.41-6.13.47**). Następnie przeprowadzano koimmunoprecypitację (**Metody 7.24**). Uzyskane próbki rozdzielano elektroforetycznie (**Metody 7.25**) w gradientowych żelach poliakrylamidowych 4-20%, Bio-rad (**Materiały 6.16.4**). Żele poliakrylamidowe barwiono Coomassie Brilliant Blue G-250 (**Metody 7.26**), a następnie przeprowadzano trawienie trypsyną (**Materiały 6.13.47**) do peptydów. Uzyskane peptydy mieszano w stosunku 1:1:1 i analizowano w spektrometrze masowym (**Metody 7.31**). Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych ze zmianą piętna (z ang. *label-swap*). W tabeli 7 przedstawiono zmianę piętna w zależności od powtórzenia biologicznego eksperymentu, tj. w pierwszym powtórzeniu biologicznym komórki wyznakowane piętnem „ciężkim” były

infekowane BHV-1 gE-GFP, w drugim powtórzeniu wirusem BHV-1 gE-TM<sup>-</sup>-GFP, a w trzecim nie były infekowane.

**Tab. 7: Zmiana piętna w znakowaniu izotopowym SILAC w trzech powtórzeniach biologicznych eksperymentu.**

	Piętno „ciężkie”	Piętno „średnie”	Piętno „lekkie”
<b>Eksperyment 1</b>	BHV-1 gE-GFP	BHV-1 gE-TM <sup>-</sup> -GFP	Komórki nieinfekowane
<b>Eksperyment 2</b>	BHV-1 gE-TM <sup>-</sup> -GFP	Komórki nieinfekowane	BHV-1 gE-GFP
<b>Eksperyment 3</b>	Komórki nieinfekowane	BHV-1 gE-GFP	BHV-1 gE-TM <sup>-</sup> -GFP

### 7.31 Spektrometria masowa

Spektrometrię masową (LC-MS/MS) przeprowadzano przy współpracy z Pathoproteomics Reserch Group (Uniwersytet Ernst Moritz Arndt, Greiswald, Niemcy), za pomocą spektrometru masowego LTQ Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific (**Materiały 6.15**), wyposażonego w system do wysokosprawnej chromatografii cieczowej EASY-nLCII nanoflow HPLC. Próbkę zawierającą peptydy zawieszano w 8 µl 5% acetonitrylu w 0,1% kwasie octowym i nanoszono na kolumnę Aeris™ 3.6 µm PEPTIDE XB-C18 100 Å, Phenomenex. Elucję peptydów prowadzono w gradiencie 1%-75% acetonitrylu w 0,1% kwasie octowym, przez 60 min. Dwadzieścia jonów o najbardziej intensywnym sygnale, o ładunku większym lub równym 2, zostało pofragmentowane poprzez dysocjację zderzeniową (z ang. *collision induced dissociation*, CID). Analizę danych przeprowadził dr Falko Hochgräfe (Pathoproteomics Reserch Group, Uniwersytet Ernst Moritz Arndt, Greiswald, Niemcy), za pomocą oprogramowania MaxQuant (wersja 1.5.3.8, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Niemcy) ze zintegrowaną wyszukiwarką Andromeda.

### 7.32 Analiza przebiegu interakcji białkowych w czasie (z ang. *time-course*)

Komórki MDBK hodowano w szalkach o średnicy 10 cm do 80% stopnia konfluencji, po czym infekowano fluorescencyjnym rekombinantem BHV-1 gE-GFP (**Materiały 6.3.2**),

w MOI=1. Po upływie 2, 6, 8, 12, 18 oraz 24 hpi, komórki zdrapywano z powierzchni płytek i lizowano buforem do lizy z CHAPS (**Materiały 6.12.11**) z dodatkiem roztworu inhibitorów proteaz (**Materiały 6.13.20**). Następnie przeprowadzano koimmunoprecypitację (**Metody 7.24**). Po koimmunoprecypitacji 40  $\mu$ l każdej próbki rozdzielano w żelu poliakrylamidowym (**Metody 7.25**) i wykonywano Western Blotting (**Metody 7.28**) z użyciem przeciwciał anti-PP1 $\alpha$  (**Materiały 6.4.6**) oraz anti-gE (**Materiały 6.4.7**).

### 7.33 Klonowanie metodą NEBuilder<sup>®</sup>

Do konstrukcji wektora plazmidowego pmCherry(C1)-PP1alfa wykorzystywano zestaw NEBuilder<sup>®</sup> HiFi DNA Assembly Cloning Kit, New England Biolabs (**Materiały 6.14.10**). Metoda NEBuilder<sup>®</sup> jest pochodną klonowania Gibsona, polegającego na łączeniu ze sobą fragmentów DNA za pomocą mieszaniny reakcyjnej zawierającej egzonukleazę, polimerazę DNA oraz ligazę DNA [434]. Fragmenty DNA do klonowania amplifikowano metodą PCR z użyciem polimerazy Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs (**Materiały 6.10**) oraz specyficznych starterów, zaprojektowanych za pomocą narzędzia NEBuilder<sup>®</sup> Assembly Tool v1.12.17 i zsyntetyzowanych w firmie Genomed (**Tab. 8**). Czas trwania, profil temperaturowy oraz ilość cykli reakcji zostały dobrane zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta polimerazy Q5 High-Fidelity DNA Polymerase. Temperatura przyłączania starterów do matrycy została określona na podstawie rekomendacji narzędzia NEBuilder<sup>®</sup> Assembly Tool v1.12.17.

Klonowanie przeprowadzano zgodnie z instrukcją dla złożenia 2-3 fragmentów, załączoną przez producenta zestawu NEBuilder<sup>®</sup> HiFi DNA Assembly Cloning Kit, New England Biolabs.

**Tab. 8: Startery do reakcji PCR poprzedzającej klonowanie metodą NEBuilder<sup>®</sup>.** Wielkimi literami została oznaczona sekwencja komplementarna do matrycy, małymi literami oznaczono sekwencje „wiszących” końców, komplementarnych do pEGFP(C1)-PP1alpha. T<sub>m</sub> – (z ang. *melting temperature*) temperatura topnienia, T<sub>a</sub> – (z ang. *annealing temperature*) temperatura przyłączania starterów rekomendowana przez producenta.

Nazwa	Sekwencja (5'→3')	T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>
pGFPC1-pp1 $\alpha$ -FOR	TCCGGACTCAGATCTCGAGCTC	70,2°C	71,2°C
pGFPC1-pp1 $\alpha$ -REV	GGTGGCGACCGGTAGCGC	74,5°C	71,2°C
NBmCherry-FOR	tagcgctaccgggtcgccaccATGCATAGCAAGGGCGAG	65,3°C	63,5°C
NBmCherry-REV	gctcgagatctgagtcgggaCGTCTTGTACAGCTCGTC	62,5°C	63,5°C

### **7.34 Transfekcja/kotransfekcja DNA plazmidowym**

Transfekcję komórek ssaczych DNA plazmidowym przeprowadzano z użyciem zestawu jetPRIME®, Polyplus (**Materiały 6.14.9**), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

### **7.35 Analiza oddziaływania białek w systemie hybrydowym F2H**

Analizę przeprowadzano w komórkach ssaczych linii F2H®-BHK (**Materiały 6.1.4**) zgodnie z zaleceniami producenta zestawu F2H Assay Kit, Chromotek (**Materiały 6.14.11**).

### **7.36 Analiza statystyczna**

Do analizy statystycznej wykorzystano test U Manna-Whitneya na poziomie istotności równym  $p=0,1$ . Test przeprowadzono za pomocą bezpłatnego narzędzia Mann-Whitney U Test Calculator, dostępnego pod adresem <http://www.socscistatistics.com>.

## **8. Wyniki**

### **8.1 Analiza przyżyciowa rozprzestrzeniania się fluorescencyjnych**

#### **rekombinantów BHV-1 na drodze CTC w hodowlach komórkowych**

W Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów MWB (wcześniej Katedrze Wirusologii Molekularnej) od ponad dwudziestu lat prowadzone są badania dotyczące procesu bezpośredniego transportu międzykomórkowego wirusa BHV-1. Jednym z głównych obszarów badania CTC jest analiza roli białkowego kompleksu gE/gI oraz kinazy US3 w tym procesie. Podstawowym narzędziem do analizy lokalizacji białek zaangażowanych w CTC oraz rozprzestrzeniania się wirusów przez różnego rodzaju połączenia komórkowe jest fluorescencyjna mikroskopia konfokalna. Obrazowanie białek wirusowych i komórkowych prowadzono zarówno poprzez barwienie immunofluorescencyjne preparatów jak i z wykorzystaniem fluorescencyjnych rekombinantów wirusowych. Dzięki zastosowaniu tych technik wykazano m. in. kluczową rolę domeny przezbłonowej białka gE w procesie CTC oraz wpływ aktywności kinazowej białka US3 na tworzenie wypustek komórkowych.

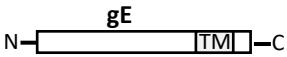
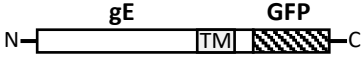
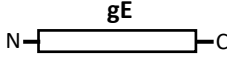
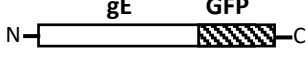
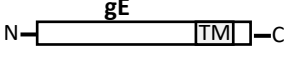
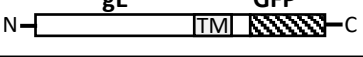
W toku eksperymentów niniejszej pracy doktorskiej zastosowano mikroskopową analizę przyżyciową do badania rozprzestrzeniania się rekombinantów BHV-1 w procesie CTC. Pracę badawczą rozpoczęto od opracowania procedury przygotowania próbek oraz sposobu długotrwałego obrazowania preparatów (ponad 12 h bez fotowysbielania), które zostały wykorzystane do badania prędkości CTC oraz analizy rozprzestrzeniania się wirusa BHV-1 w międzykomórkowych nanorurkach.

#### **8.1.1 Określenie prędkości rozprzestrzeniania się fluorescencyjnych rekombinantów wirusowych BHV-1 na drodze CTC w żywych komórkach różnego typu.**

W tej części pracy doktorskiej opracowano precyzyjny test pozwalający na określenie prędkości rozprzestrzeniania się wirusów na drodze CTC. W teście wykorzystano fluorescencyjne mutanty BHV-1 w połączeniu z analizą przyżyciową z zastosowaniem fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej. Do ustalenia wpływu mutacji białek gE oraz US3 na prędkość rozprzestrzeniania się wirusa, wykorzystano rekombinanty

BHV-1 gE-GFP, gETM<sup>-</sup>-GFP oraz gE-GFPΔUS3 (**Tab. 9**). Rekombinant gE-GFP posiada pełnej długości gE z fuzją GFP na C-końcu białka. BHV-1 gETM<sup>-</sup>-GFP koduje skróconą wersję białka gE, pozbawioną domeny cytoplazmatycznej i przezbłonowej. Mutant gE-GFPΔUS3, poza fuzją gE-GFP, pozbawiony jest genu kodującego US3. Wszystkie trzy rekombinanty gE tworzą kompleks z glikoproteiną gl. W przypadku skróconej formy białka gE, kompleks pozostaje rozproszony w cytoplazmie infekowanych komórek i nie lokalizuje się w połączeniach komórkowych. Fuzja z białkiem zielonej fluorescencji nie wpływa znacząco na replikację wirusa oraz na jego transmisję w porównaniu do niefluorescencyjnych mutantów (gETM<sup>-</sup> i ΔUS3), czy w przypadku BHV-1 gE-GFP do wirusa WT. Eksperymenty przeprowadzono w środowisku przeciwciał neutralizujących wirusa rozprzestrzeniającego się na drodze CFE (zwanego dalej wirusem zewnątrzkomórkowym), po uprzedniej optymalizacji właściwej ilości surowicy w medium. Wyniki testu prędkości CTC porównano do tych, uzyskanych w standardowym teście wielkości łysinek wirusowych. W obu metodach użyto dwóch typów komórek bydlęcych - linii komórek nowotworowych MDBK, pochodzących z nabłonka nerki oraz pierwotnych fibroblastów.

**Tab. 9: Rekombinanty BHV-1 użyte do testu prędkości CTC oraz do testu wielkości łysinek wirusowych.** W tabeli zaznaczono konstrukty gE w zależności od rekombinanta oraz lokalizację wewnątrzkomórkową kompleksu gE/gl. +/- obecność/brak kompleksu gE/gl lub białka US3; TM - (z ang. *transmembrane domain*), domena przezbłonowa gE.

BHV-1	Konstrukty gE	gE/gl	US3	Lokalizacja gE/gl
WT	N-  -C	+	+	Aparat Golgiego; Połączenia międzykomórkowe
gE-GFP	N-  -C	+	+	Aparat Golgiego; Połączenia międzykomórkowe
gETM <sup>-</sup>	N-  -C	+	+	Cytoplazma
gETM <sup>-</sup> -GFP	N-  -C	+	+	Cytoplazma
ΔUS3	N-  -C	+	-	Aparat Golgiego; Połączenia międzykomórkowe
gE-GFP ΔUS3	N-  -C	+	-	Aparat Golgiego; Połączenia międzykomórkowe

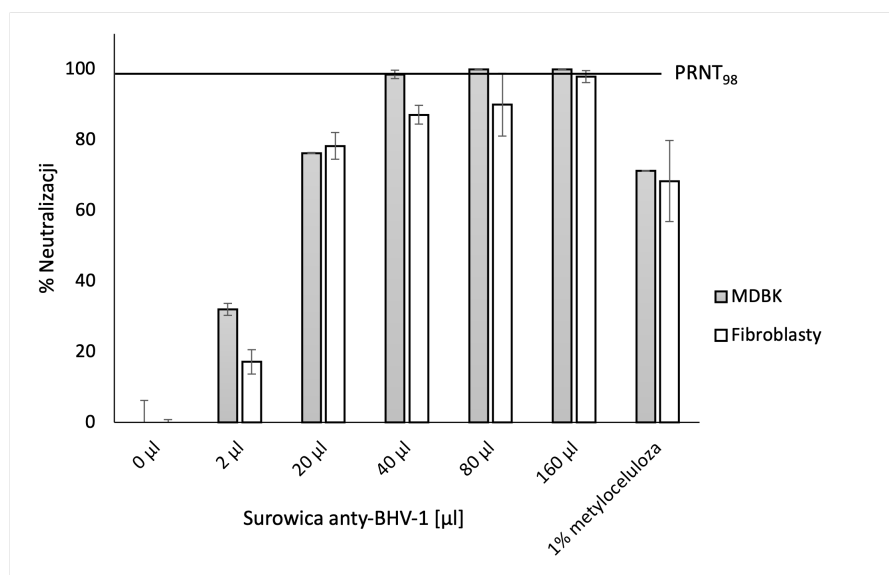
#### 8.1.1.1 Optymalizacja ilości surowicy anty-BHV-1 do neutralizacji wirusa zewnątrzkomórkowego

By przeprowadzić analizę rozprzestrzeniania się wirusa BHV-1 na drodze CTC, konieczne jest ograniczenie transmisji wirusa poprzez środowisko zewnątrzkomórkowe. Jak już wspomniano w **podrozdziale 4.4.1**, w tym celu można zastosować media hodowlane z dodatkiem agarozy lub metylocelulozy albo odpowiedniej ilości surowicy neutralizującej wirusa zewnątrzkomórkowego. Ponieważ agarozą i metylocelulozą stanowi jedynie barierę mechaniczną dla CFE, do kolejnych testów użyto surowicy neutralizującej wirusa BHV-1 (**Materiały 6.4.1**). Optymalną ilość surowicy blokującej CFE przez przynajmniej 48 h po infekcji określono za pomocą testu neutralizacji wirusa zewnątrzkomórkowego, opartego o klasyczny test PRNT (z ang. *plaque reduction neutralization test*). W standardowym teście PRNT oznaczane jest miano surowicy, przy którym występuje redukcja ilości łysinek wirusowych, najczęściej o 50% (PRNT<sub>50</sub>) lub o 90% (PRNT<sub>90</sub>), w porównaniu do kontroli. W procedurze testu taka sama ilość PFU cząstek infekcyjnych wirusa inkubowana jest ze zmienną ilością surowicy a następnie dodawana do hodowli komórkowej. Po pojawieniu się łysinek wirusowych są one barwione fioletem krystalicznym lub immunochemicznie i zliczane. Brak łysinek wirusowych jest tożsamy ze 100% neutralizacją wirusa przez badaną surowicę.

W teście neutralizacji wirusa zewnątrzkomórkowego (**Metody 7.4**) komórki MDBK oraz pierwotne bydlęce fibroblasty infekowano wirusem BHV-1 WT w ilości 50 PFU/ml. Po 1 h inkubacji inokulum zastąpiono czystą pożywką, medium zawierającym surowicę neutralizującą (2, 20, 40, 80, 160  $\mu$ l) (**Materiały 6.4.1**) lub z 1% roztworem metylocelulozy w medium (**Materiały 6.12.2**). By określić ilość infekcyjnych cząstek wirusowych, niezablokowanych przez przeciwciała neutralizujące w środowisku zewnątrzkomórkowym, po 48 h zebrano medium, wykonano rozcieńczenia dziesiętne i dodano do świeżej hodowli komórek. Po kolejnych 48 h inkubacji łysinki wirusowe barwiono w teście IPMA (**Metody 7.5**) z wykorzystaniem przeciwciał anty-gB (**Materiały 6.4.2**). Następnie łysinki wirusowe zliczano by określić ilość surowicy, która blokowała wirusa zewnątrzkomórkowego (**Ryc. 22**). Redukcję ilości łysinek wirusowych na poziomie powyżej 70% w porównaniu do kontroli zaobserwowano już po dodaniu 20  $\mu$ l surowicy neutralizującej w obu analizowanych liniach komórkowych. Ponieważ nie udało się osiągnąć neutralizacji na poziomie 100% w hodowli bydlęcych fibroblastów,



zastosowano PRNT<sub>98</sub>. Neutralizację na poziomie 98% uzyskano dla 40 µl surowicy w przypadku komórek MDBK i 160 µl dla pierwotnych bydlęcych fibroblastów. Zastosowanie metylocelulozy w medium ograniczało rozprzestrzenianie się wirusa BHV-1 na drodze CFE w ok. 71% w komórkach MDBK i w ok. 68% w bydlęcych fibroblastach.



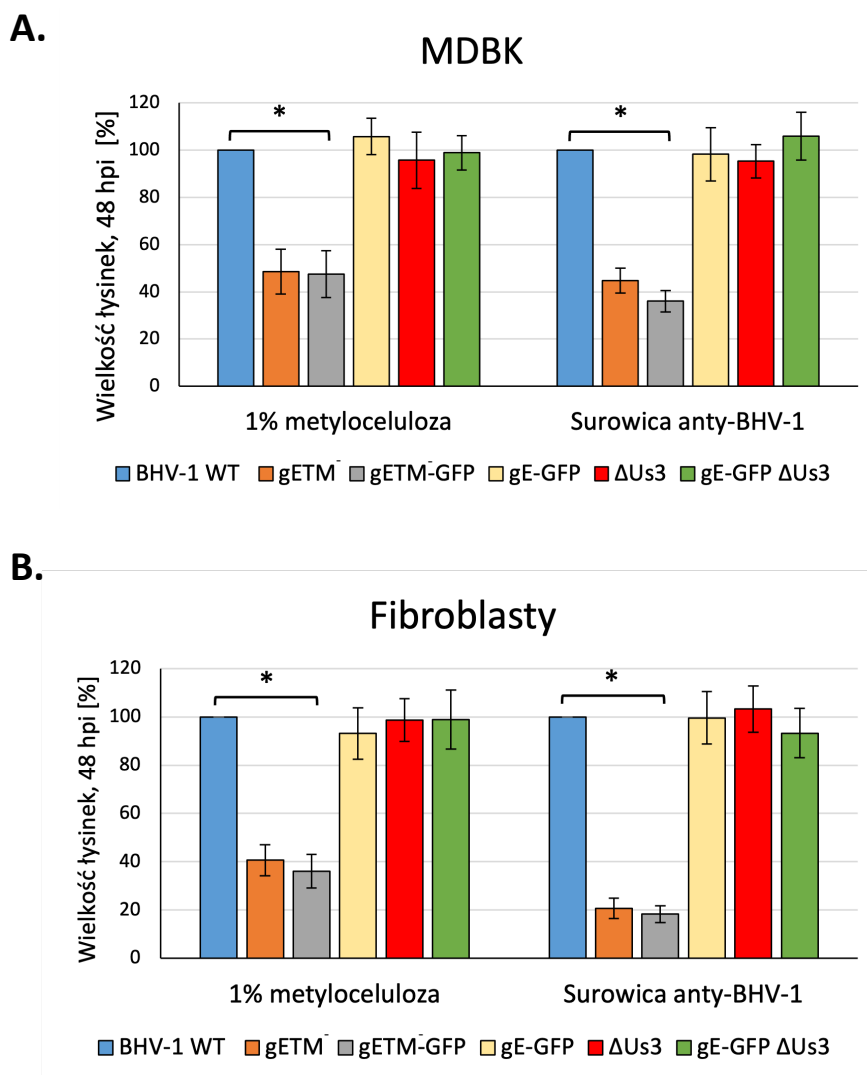
**Ryc. 22: Test neutralizacji zewnątrzkomórkowego BHV-1.** Komórki MDBK oraz pierwotne fibroblasty bydlęce infekowano wirusem BHV-1 WT, w ilości 50 PFU/ml. Następnie inkubowano przez 48 h w medium zawierającym surowicę neutralizującą lub w 1% roztwór metylocelulozy. Medium zebrano i miareczkowano. Wybarwione immunochemicznie łyśinki wirusowe zostały zliczone. Stopień neutralizacji wirusa zewnątrzkomórkowego określono jako procent w odniesieniu do próbki kontrolnej, niezawierającej surowicy neutralizującej ani 1% roztworu metylocelulozy w medium.

#### 8.1.1.2 Test wielkości łyśinek wirusowych - preferowana droga transmisji BHV-1 w infekcji komórek różnego pochodzenia

Klasyczny test wielkości łyśinek wirusowych jest złotym standardem w badaniu transmisji wirusów na drodze CTC. Zmniejszona wielkość łyśinek wirusowych generowanych przez rekombinanta względem typu dzikiego, świadczy zwykle o roli zmutowanego czynnika w procesie CTC lub w replikacji wirusa. Test wielkości łyśinek wirusowych (**Metody 7.6**) wykonano dla określenia wpływu mutacji gE oraz US3 na rozprzestrzenianie się wirusów na drodze CTC w środowisku przeciwciał neutralizujących. Wyniki testu wykorzystano również do późniejszego porównania z testem prędkości CTC z zastosowaniem mikroskopowej analizy przyżyciowej. Do tego eksperymentu

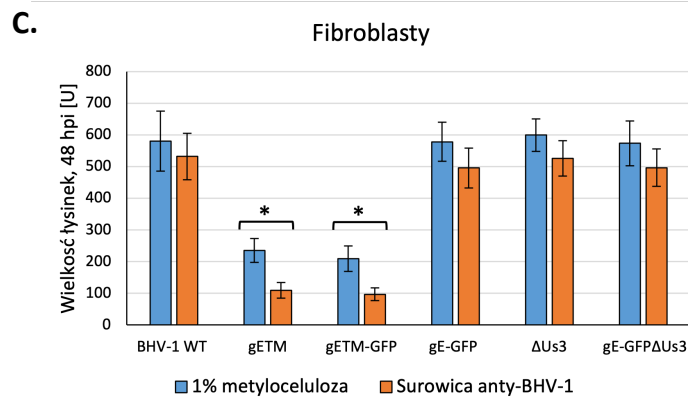
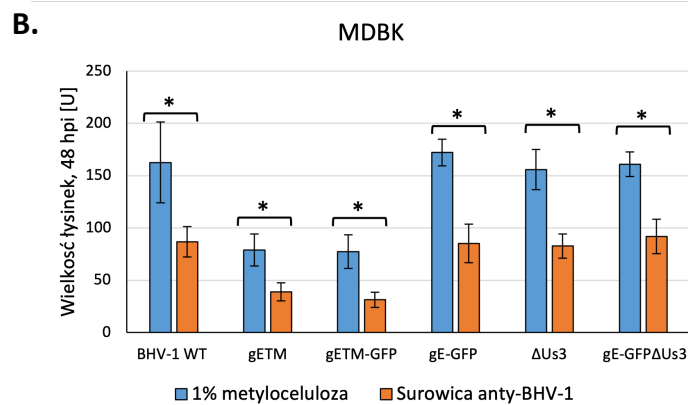
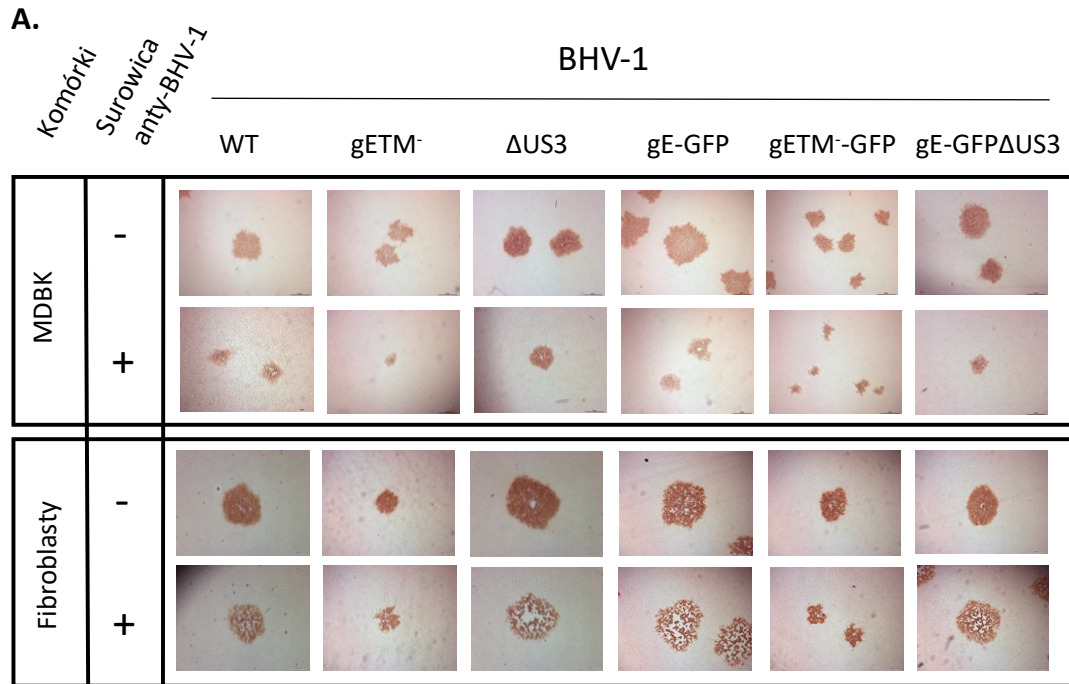
wykorzystano BHV-1 WT, mutanty gE pozbawione domeny przezbłonowej i cytoplazmatycznej oraz mutanty delecyjne US3 (**Tab. 9**).

Tak jak w teście neutralizacji wirusa zewnątrzkomórkowego, komórki MDBK oraz bydlęce fibroblasty infekowano BHV-1 WT oraz mutantami w ilości 50 PFU/ml. Po 1 h inokulum zastąpiono 1% roztworem metylocelulozy w medium lub medium zawierającym 40  $\mu$ l surowicy neutralizującej w przypadku komórek MDBK i 160  $\mu$ l w hodowli fibroblastów bydlęcych. Po 48 h od infekcji komórki zostały utrwalone i wybarwione immunochemicznie przy pomocy przeciwciał anti-gB w teście IPMA. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. Średnią wielkość tysinek wirusowych formowanych przez BHV-1 WT oraz jego rekombinanty obliczono z pomiarów 150 tysinek wirusowych. Uzyskane dane przedstawiono jako procent wielkości w odniesieniu do tysinek wirusowych formowanych przez BHV-1 WT, których średnia wielkość została oznaczona jako 100%. Rekombinanty BHV-1 gETM<sup>-</sup> oraz gETM<sup>-</sup>-GFP formowały tysinki wirusowe zmniejszone o ok. 52% względem wirusa WT w komórkach MDBK w roztworze 1% metylocelulozy w medium oraz odpowiednio o 55% i 64% w środowisku przeciwciał neutralizujących. W przypadku bydlęcych fibroblastów, delecja domeny przezbłonowej oraz cytoplazmatycznej gE powodowała zmniejszenie tysinek wirusowych o ok. 65% w 1% roztworze metylocelulozy w medium i o ok. 80% w surowicy neutralizującej. Powyższa analiza potwierdziła kluczową rolę gE/gI w procesie CTC w obu typach komórek. W odróżnieniu od gE-TM<sup>-</sup>, dla mutantów delecyjnych US3 nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w wielkości tysinek wirusowych w odniesieniu do BHV-1 WT zarówno pod metylocelulozą, jak i w środowisku przeciwciał neutralizujących w medium, w obu badanych typach komórek.



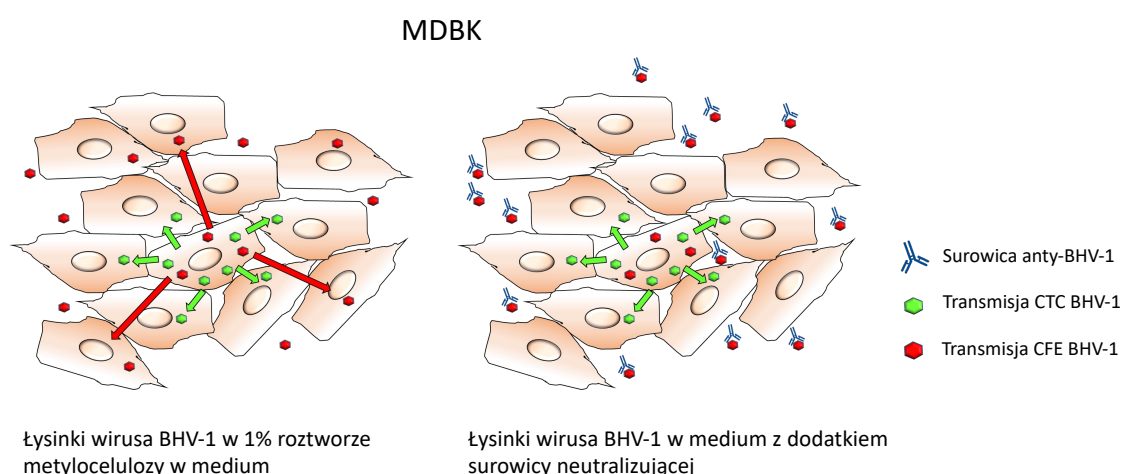
**Ryc. 23: Wpływ mutacji białek gE oraz US3 na wielkość łyśinek wirusowych w komórkach MDBK (A.) oraz w pierwotnych bydlęcych fibroblastach (B.)** [\*] istotna statystycznie różnica w wielkości łyśinek wirusowych w odniesieniu do wirusa BHV-1 WT (100%). Test U Manna-Whitneya;  $p < 0,01$ .

Ponadto porównano wielkość łyśinek wirusowych formowanych w medium z dodatkiem 1% metylocelulozy i w środowisku surowicy anty-BHV-1 (**Ryc. 24**). Zaobserwowano, że łyśinki wirusa BHV-1 WT oraz wszystkich analizowanych rekombinantów w hodowli komórek MDBK były o ok. 50% mniejsze w środowisku surowicy neutralizującej niż te w medium z 1% roztworem metylocelulozy. W bydlęcych fibroblastach jedynie łyśinki formowane przez rekombinanty BHV-1 gETM<sup>-</sup> oraz gETM<sup>-</sup>-GFP były o ok. 20% mniejsze od tych w 1% roztworze metylocelulozy w medium.



**Ryc. 24: Porównanie wielkości łysinek wirusowych formowanych w medium zawierającym 1% metylcelulozę lub surowicę anty-BHV-1 w hodowli komórek MDBK i pierwotnych bydlęcych fibroblastów.** (A.) Łysinki wirusowe barwione w teście IPMA z wykorzystaniem przeciwciał anti-gB (1:000) oraz II-rz. przeciwciał anti-mysich-HRP (1:000). (B.) Średnia wielkość łysinek wirusowych w komórkach MDBK i fibroblastach, oznaczona w jednostkach arbitralnych (U); słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe; [\*] istotna statystycznie różnica w wielkości łysinek wirusowych pomiędzy 1% metylcelulozą a surowicą neutralizującą w medium; Test U Manna-Whitneya;  $p < 0,01$ .

Wyniki powyższej analizy mogą wskazywać na preferowaną drogę infekcji wirusów w zależności od typu infekowanych komórek. W komórkach MDBK, w związku ze znaczną redukcją wielkości łysek wirusowych w obecności przeciwciał neutralizujących, pojedyncza łyseka wirusowa w 1% roztworze metylocelulozy w medium może być wynikiem działania obu typów transmisji wirusa - CFE i CTC (**Ryc. 25**). W pierwotnych fibroblastach nie odnotowano zmniejszenia wielkości łysek wirusa WT w obecności przeciwciał neutralizujących. Wskazuje to na niezakłóconą transmisję w warunkach neutralizacji wirusa zewnątrzkomórkowego, a co za tym idzie, na CTC jako preferowaną drogę infekcji.



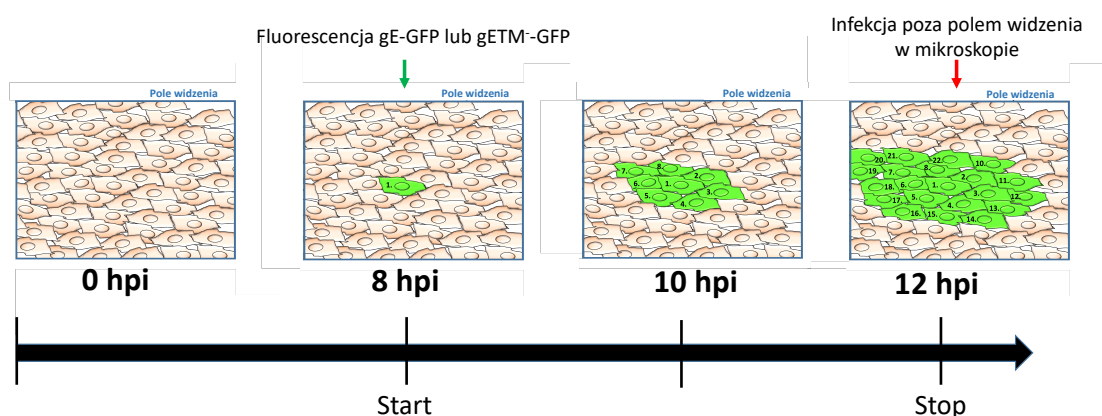
**Ryc. 25: Schemat przedstawiający przypuszczalną drogę transmisji BHV-1 w komórkach MDBK w medium zawierającym 1% metylocelulozę lub surowicę neutralizującą.** Czerwone strzałki pokazują drogę infekcji ze środowiska zewnątrzkomórkowego (CFE); zielone strzałki pokazują bezpośredni transport międzykomórkowy (CTC).

### 8.1.1.3 Prędkość CTC - znaczenie typu komórek i mutacji białek wirusowych

Dla lepszego zrozumienia dynamiki CTC wirusa BHV-1 oraz zbadania wpływu mutacji gE oraz US3 na przebieg tego procesu, opracowano nową metodę obrazowania infekcji w czasie rzeczywistym za pomocą analizy przyżyciowej we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym. Do tego eksperymentu użyto fluorescencyjnych rekombinantów BHV-1 - gE-GFP, gETM<sup>-</sup>-GFP oraz gE-GFPΔUS3.

Badanie prędkości CTC (**Metody 7.7**) przeprowadzono w dwóch typach komórek - MDBK i pierwotnych fibroblastach bydlęcych. Podobnie jak w teście wielkości łysek wirusowych, komórki infekowano fluorescencyjnymi rekombinantami BHV-1 w ilości 50 PFU/ml. Po 1 h inkubacji inokulum zastąpiono medium zawierającym surowicę

neutralizującą - 40  $\mu$ l w hodowli komórek MDBK i 160  $\mu$ l w przypadku fibroblastów bydlęcych. Analizę rozpoczęto ok. 8 h po infekcji, gdy zaobserwowano początek fluorescencji białek fuzyjnych w obu typach komórek (**Ryc. 26**). Obraz zbierano co 12 s przy długości fali wzbudzenia GFP równej 475 nm, z użyciem obiektywu 63x. Prędkość CTC została określona jako ilość komórek infekowanych w środowisku surowicy neutralizującej wirusa na godzinę. Obserwacje prowadzono do momentu postępu infekcji poza pole widzenia mikroskopu. Ponieważ w przypadku fibroblastów bydlęcych był to czas ok. 5 h (12 hpi), obserwacje w komórkach MDBK również zostały przerwane na tym etapie. Średnia prędkość CTC została obliczona na podstawie zliczania komórek z 20 różnych łysinek wirusowych w czasie rzeczywistym. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych oraz trzech powtórzeniach technicznych.

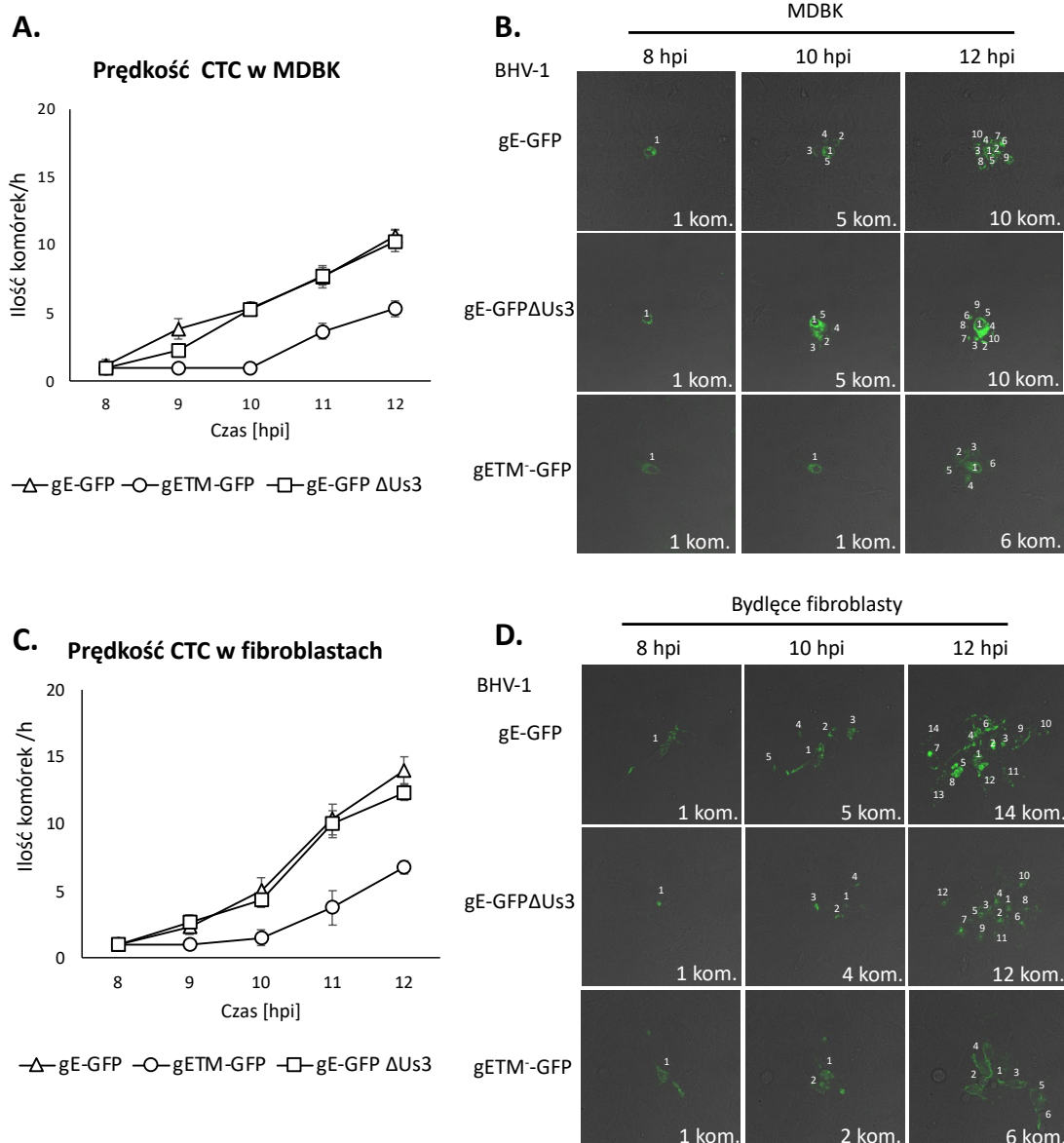


**Ryc. 26: Schemat przedstawiający ramy czasowe obserwacji w teście prędkości CTC.** Analizę rozpoczęto 8 h po infekcji (hpi), gdy zaobserwowano fluorescencję białek fuzyjnych w pojedynczych komórkach. Obraz zbierano co 12 s, do momentu postępu infekcji poza pole widzenia mikroskopu (12 hpi).

W komórkach MDBK jak i fibroblastach bydlęcych, prędkość CTC rekombinantów gE-GFP oraz gE-GFP $\Delta$ US3, podobnie jak w teście wielkości łysinek wirusowych, nie różniła się istotnie (**Ryc. 27**). Oba rekombinanty w czasie 5 h obserwacji zainfekowały ok. 10 komórek MDBK i 12-14 fibroblastów. Mutant BHV-1 gETM<sup>-</sup>-GFP zainfekował o 50% mniej komórek MDBK i fibroblastów bydlęcych w porównaniu do BHV-1 gE-GFP. W teście wielkości łysinek wirusowych natomiast, rekombinant BHV-1 gETM<sup>-</sup>-GFP formował łysinki zmniejszone względem BHV-1 gE-GFP o ok. 61% w komórkach MDBK i o 75% w fibroblastach.

Analiza przyżyciowa w czasie rzeczywistym poza końcowym zliczeniem wszystkich zainfekowanych komórek, dała przede wszystkim wgląd w dynamikę CTC w każdej

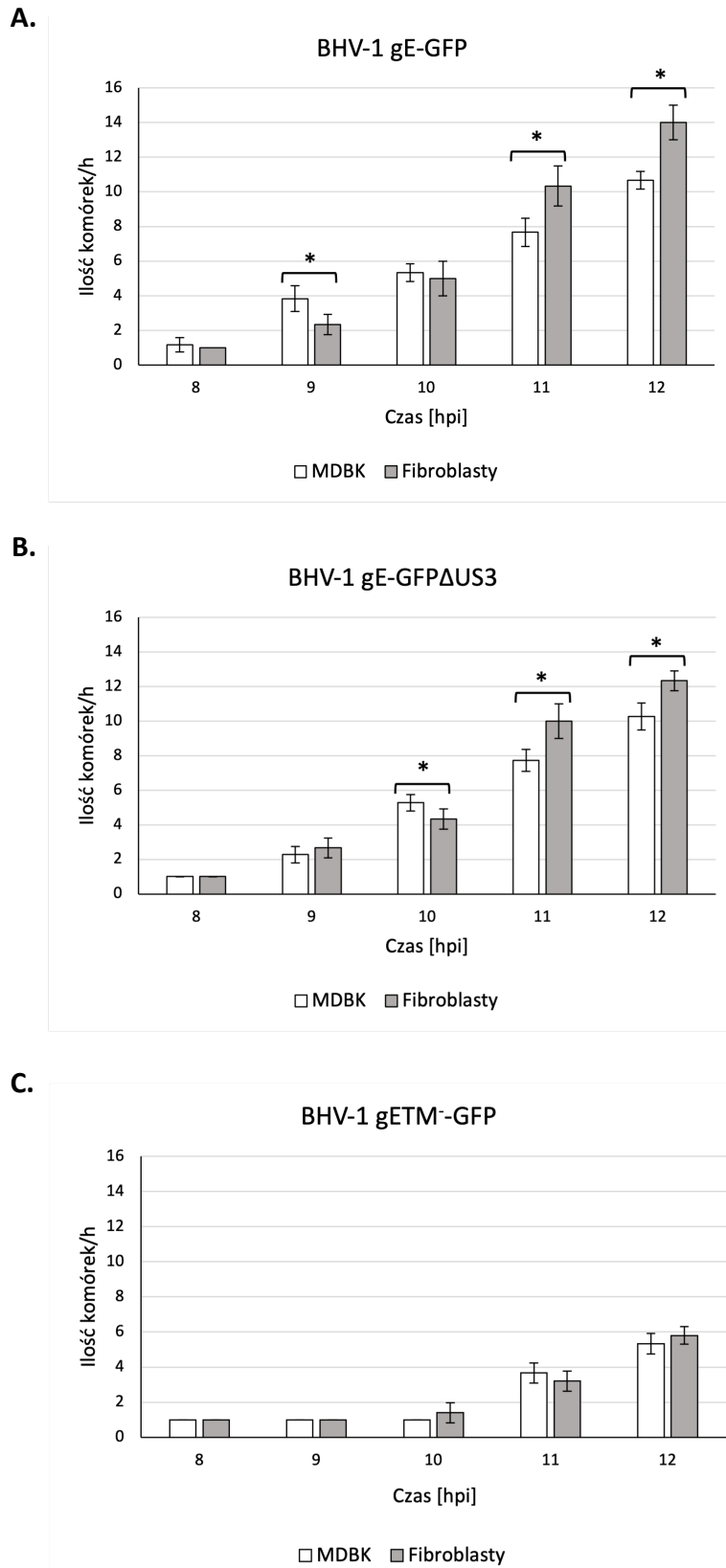
godzinie obserwacji. Dzięki temu zaobserwowano różnicę w 9 h od infekcji pomiędzy tempem rozprzestrzeniania się rekombinantów BHV-1 gE-GFP oraz BHV-1 gE-GFP $\Delta$ US3 w komórkach MDBK. Rekombinant z delecją US3 infekował średnio 2,3 komórki w ciągu 9 hpi, podczas gdy BHV-1 gE-GFP średnio 3,8 komórki. Od 10 hpi do 12 hpi ta różnica została zniwelowana i oba rekombinanty rozprzestrzeniały się z podobną prędkością.



**Ryc. 27: Porównanie prędkości CTC rekombinantów BHV-1 gE-GFP, gETM-GFP oraz gE-GFPΔUS3 w komórkach MDBK i pierwotnych fibroblastach bydłęcych.** (A. i C.) Ilość komórek MDBK oraz fibroblastów bydłęcych infekowanych rekombinantami w ciągu każdej godziny obserwacji (8-12 hpi). Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe. (B. i D.) Przykładowe obrazy z filmów pokładkowych przedstawiających proces transmisji rekombinantów BHV-1 wraz ze zliczaniem infekowanych komórek MDBK oraz fibroblastów bydłęcych w czasie 8, 10 oraz 12 hpi. W prawym dolnym rogu każdego z obrazów oznaczono ilość komórek (kom.) infekowanych w danym punkcie czasowym. Obraz zbierano co 12 s w ciągu 5 h obserwacji we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym (Leica SP8X), przy użyciu obiektywu 63x. Kolor zielony: fluorescencja gE-GFP. Dodatkowe materiały: **film 1**.



Ponadto dzięki testowi prędkości możliwe było porównanie tempa transmisji na drodze CTC pomiędzy różnymi typami komórek (**Ryc. 28**). Otrzymane wyniki pokazały, że w 9-10 godzinie po infekcji tempo rozprzestrzeniania się wirusa BHV-1 gE-GFP było szybsze w komórkach MDBK (ok. 3,8 komórki w 9 hpi) niż w fibroblastach (ok. 2,3 komórki w 9 hpi). Jednak już w 11 hpi tempo transmisji tego rekombinanta wzrosło w fibroblastach bydlęcych o ok. 25%. Podobną prawidłowość zaobserwowano dla mutantu gE-GFP $\Delta$ US3 w 10 hpi - w fibroblastach infekcji uległo ok. 4,3 komórek, natomiast w komórkach MDBK ok. 5,3 komórek. W następnej godzinie infekcji także w tym wypadku zaobserwowano przyspieszenie tempa transmisji na korzyść komórek pierwotnych - ok. 10 fibroblastów oraz ok. 7,7 komórek MDBK. Dla rekombinanta gETM<sup>-</sup>-GFP nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy tempem transmisji w obu badanych typach komórek (**Ryc. 28 C**).

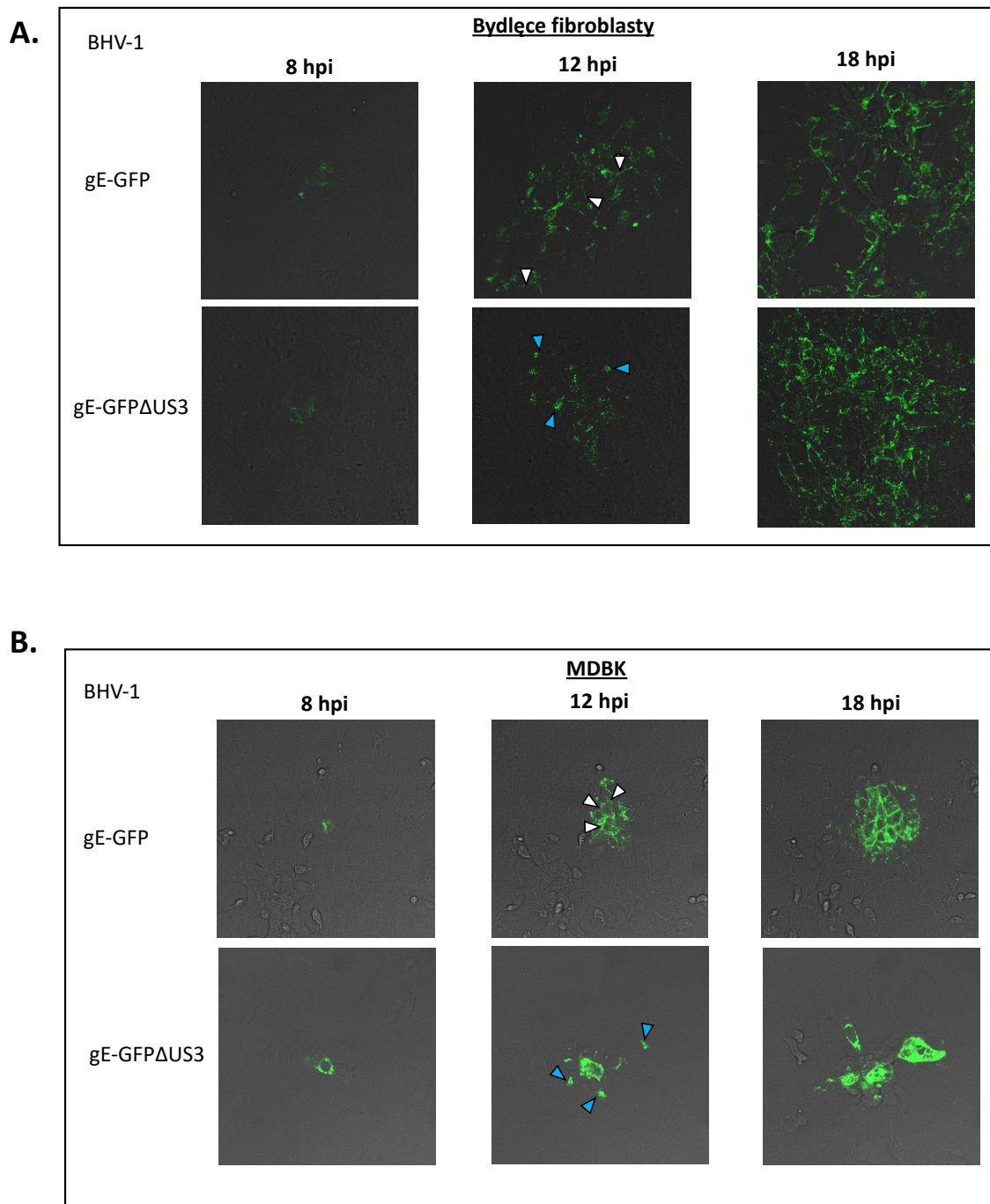


**Ryc. 28: Porównanie prędkości transmisji na drodze CTC rekombinantów BHV-1 gE-GFP (A.), BHV-1 gE-GFP $\Delta$ US3 (B.) i BHV-1 gETM<sup>-</sup>-GFP (C.) w zależności od typu komórek. [\*] istotna statystycznie różnica w prędkości transmisji rekombinantów na drodze CTC pomiędzy komórkami MDBK a pierwotnymi fibroblastami bydłęcymi. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe. Test U Manna-Whitneya;  $p < 0,01$ .**

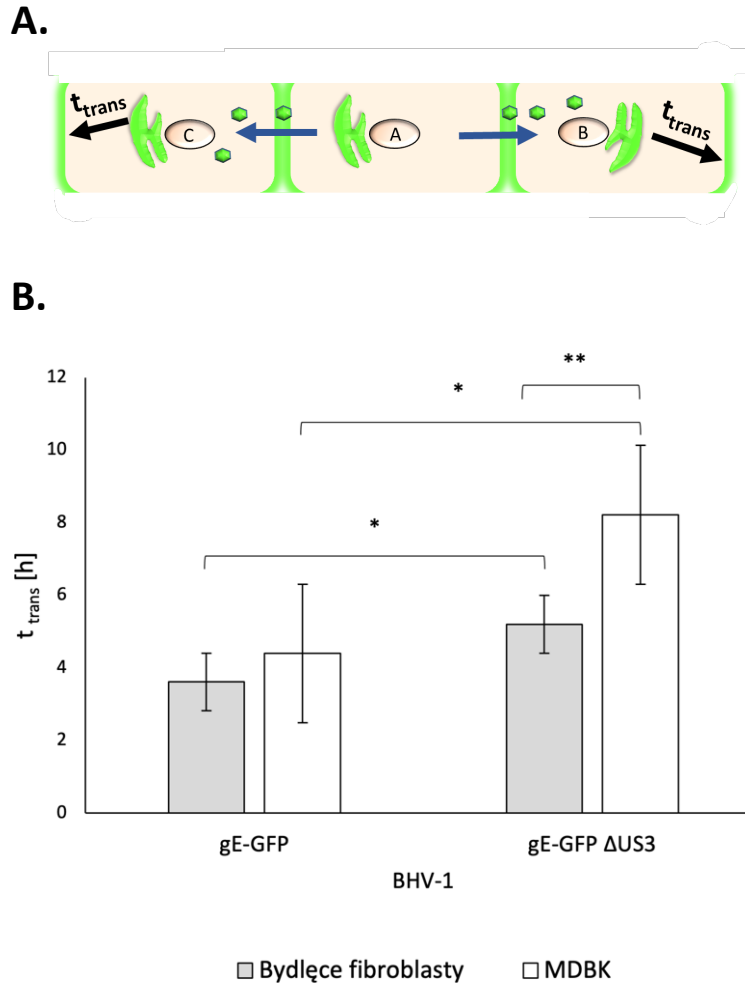
#### 8.1.1.4 Wpływ białka US3 na lokalizację błonową gE na wczesnym etapie formowania łysinki wirusowej

Użycie fluorescencyjnych rekombinantów BHV-1 w teście prędkości CTC, umożliwiło również śledzenie lokalizacji wewnątrzkomórkowej gE-GFP w trakcie formowania łysinek wirusowych oraz analizę wpływu delecji US3 na ten proces. W trakcie analizy filmów poklatkowych zaobserwowano wyraźne opóźnienie lokalizacji gE w połączeniach komórkowych przy delecji US3 w porównaniu do infekcji rekombinantem BHV-1 gE-GFP zarówno w komórkach MDBK, jak i bydlęcych fibroblastach (**Ryc. 29**). Dodatkowo zaobserwowano zmienioną morfologię łysinek formowanych przez rekombinanta BHV-1 gE-GFP $\Delta$ US3 w komórkach MDBK - łysinki BHV-1 gE-GFP $\Delta$ US3 miały nieregularny kształt a komórki obkurczały się w ich centrum.

W związku z tymi obserwacjami, zmierzono czas translokacji gE z aparatu Golgiego do połączeń komórkowych przy infekcji rekombinantami BHV-1 gE-GFP oraz BHV-1 gE-GFP $\Delta$ US3 (**Ryc. 30**). W obu typach komórek zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w czasie translokacji między badanymi rekombinantami. W fibroblastach bydlęcych czas translokacji wyniósł 3,6 h (ok. 11,6 hpi) dla rekombinanta BHV-1 gE-GFP i 5,2 h (ok. 13,2 hpi) dla BHV-1 gE-GFP $\Delta$ US3. W komórkach MDBK, czas translokacji gE z aparatu Golgiego do połączeń międzykomórkowych wyniósł ok. 4,3 h (ok. 12,3 hpi), a w przypadku delecji US3 było to 8,2 h (ok. 16,2 hpi). Różnica w lokalizacji gE w zależności od obecności lub braku US3 była najlepiej widoczna do 12 h od infekcji. W 18 godzinie od infekcji, nie zaobserwowano opóźnienia w translokacji gE do membran komórek infekowanych rekombinantem gE-GFP $\Delta$ US3.



**Ryc. 29: Opóźnienie lokalizacji gE-GFP w błonach komórkowych bydłęcych fibroblastów (A.) i komórek MDBK (B.) infekowanych rekombinantem gE-GFPΔUS3.** Rycina przedstawia przykładowe obrazy zebrane w trakcie analizy przyżyciowej w 8, 12 i 18 hpi we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym (Leica SP8X). Białe strzałki wskazują na lokalizację gE-GFP w błonach komórkowych. Niebieskie strzałki wskazują na lokalizację gE-GFP w aparacie Golgiego. Obrazy zbierano co 12 s w ciągu 10 h obserwacji przy użyciu obiektywu 63x. Kolor zielony: fluorescencja gE-GFP. Dodatkowe materiały: **filmy 2-5.**

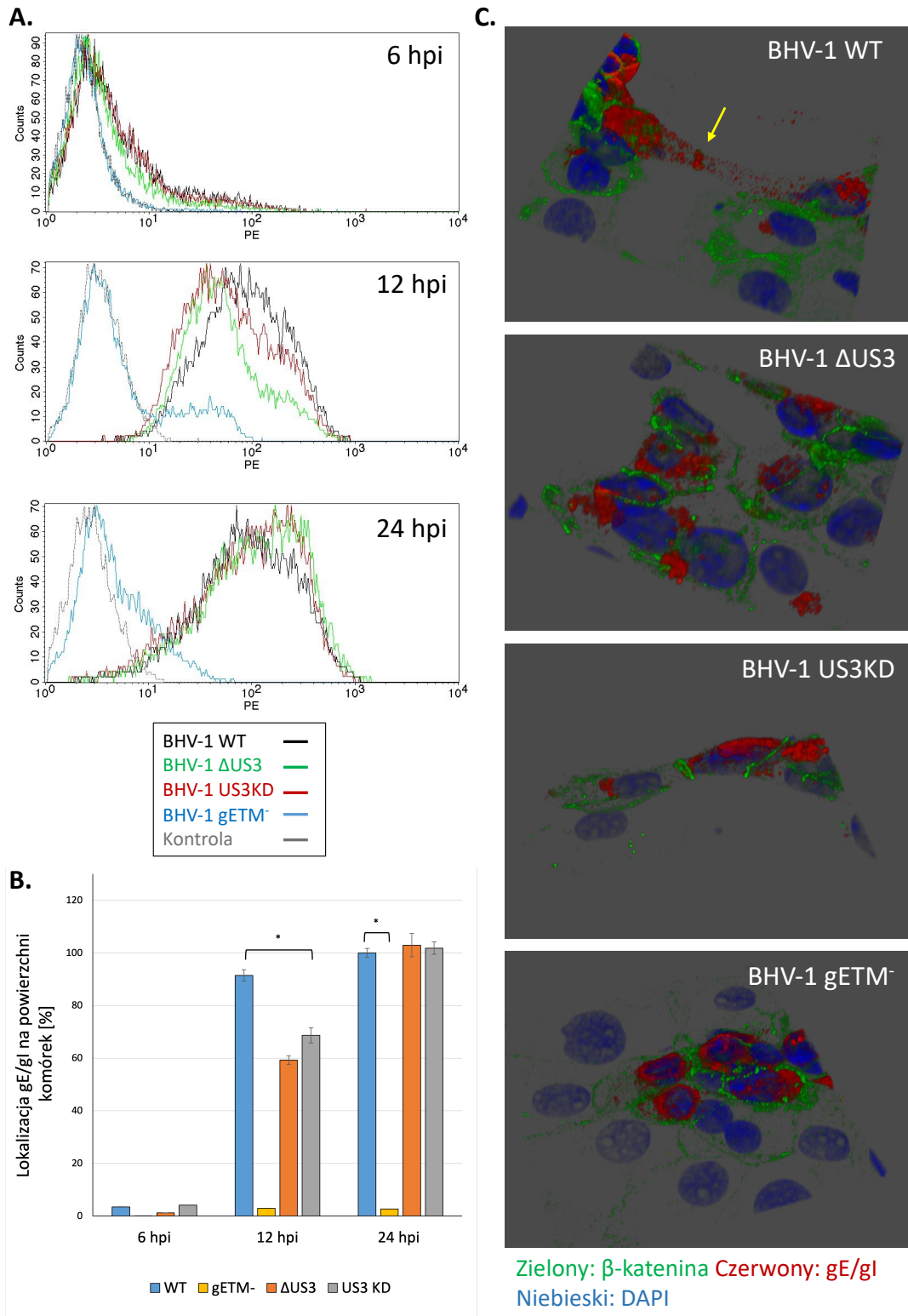


**Ryc. 30: Pomiar czasu translokacji gE-GFP z aparatu Golgiego do połączeń komórkowych.**

(A.) Schemat wykonania pomiaru czasu translokacji gE-GFP. Komórka „A” została zainfekowana jako pierwsza po dodaniu inokulum wirusa do hodowli. Następnie doszło do transmisji na drodze CTC do komórek sąsiadujących - „B” i „C”. Czas mierzony od pojawienia się sygnału fluorescencyjnego w aparacie Golgiego komórek „B” i „C”, a jego przejściem do połączeń komórkowych oznaczono jako czas translokacji ( $t_{trans}$ ). (B.) Wykres przedstawia czas translokacji kompleksu gE-GFP w komórkach MDBK i bydłących fibroblastach zakażonych BHV-1 gE-GFP i gE-GFPΔUs3. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Dane zebrano z dziesięciu pozycji w mikroskopie konfokalnym w 5 oddzielnych eksperymentach. [\*] istotna statystycznie różnica  $t_{trans}$  gE-GFP między mutantami BHV-1 w fibroblastach bydłących; [\*\*] istotna statystycznie różnica  $t_{trans}$  gE-GFP między mutantami BHV-1 w komórkach MDBK; [\*\*\*] istotna statystycznie różnica  $t_{trans}$  gE-GFP między typami komórek. Test U Manna-Whitneya;  $p < 0,01$ .

Dla potwierdzenia wyników obserwacji mikroskopowych, przeprowadzono analizę lokalizacji błonowej kompleksu gE/gI metodą cytometrii przepływowej (**Metody 7.8**). W związku z emisją fluorescencji GFP niezależnie od lokalizacji gE na powierzchni lub wewnątrz komórek, do infekcji użyto wirusa BHV-1 WT oraz nieznakowanych fluorescencyjnie rekombinantów:  $\Delta$ US3 (**Materiały 6.3.5**), rekombinanta z nieaktywną kinazowo formą US3 – BHV-1 US3KD (**Materiały 6.3.6**) oraz jako kontroli mutantu gE-TM<sup>-</sup> ze skróconą formą gE, nielokalizującą się w połączeniach komórkowych. Analizę przeprowadzono w komórkach MDBK, które zbierano w 6, 12 i 24 h od infekcji. By wykryć lokalizację gE jedynie w połączeniach komórkowych, pominięto etap permeabilizacji błon. Detekcję kompleksu gE/gI lub gETM<sup>-</sup>/gI prowadzono przy użyciu przeciwciał anti-gE/gI (**Materiały 6.4.3**) oraz przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z PE (**Materiały 6.4.8**). Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. Wyniki analizy w cytometrze przepływowym potwierdziły wcześniejsze obserwacje mikroskopowe (**Ryc. 31 A i B**). W 12 godzinie po infekcji komórki infekowane mutantem delecyjnym US3 oraz nieaktywnym kinazowo, miały odpowiednio o 40% i 32% mniej kompleksu gE/gI na powierzchni błon komórkowych w porównaniu do BHV-1 WT. Po 24 godzinach od infekcji, nie zaobserwowano żadnej różnicy w ilości kompleksu gE/gI na powierzchni komórek między infekcją wirusem WT oraz rekombinantami US3.

Dodatkowo po 12 hpi wykonano barwienie immunofluorescencyjne (**Metody 7.9**) kompleksu gE/gI w połączeniach komórek MDBK infekowanych rekombinantami użytymi do analizy cytometrycznej (**Ryc. 31 C**). Detekcję przeprowadzono również z wykorzystaniem przeciwciał anti-gE/gI (czerwony). Ponadto wybarwiono jądra komórkowe barwnikiem DAPI (niebieski) oraz błony komórkowe przy użyciu przeciwciał anti- $\beta$ -katenina (zielony). By lepiej zwizualizować połączenia komórkowe, preparaty mikroskopowe obrazowano trójwymiarowo (3D) poprzez wykonanie 10 zdjęć w osi Z i złożenie w programie Leica Software LasX. Po 12 hpi nie zaobserwowano kompleksu gE/gI w połączeniach komórek MDBK infekowanych rekombinantami  $\Delta$ US3 oraz US3 KD. Wirus gETM<sup>-</sup>, tak jak w cytometrii przepływowej, stanowił kontrolę negatywną lokalizacji błonowej kompleksu gE/gI.



**Ryc. 31: Lokalizacja kompleksu gE/gI w komórkach MDBK infekowanych mutantami US3.** (A.) Przykładowe histogramy analizy cytometrycznej lokalizacji kompleksu gE/gI na powierzchni komórek MDBK w 6, 12 i 24 hpi. (B.) Porównanie ilościowe lokalizacji kompleksu gE/gI na powierzchni komórek w odniesieniu do BHV-1 WT 24 hpi (100%). Słupki błędów oznaczają odchylenia standardowe. [\*] istotna statystycznie różnica między ilością gE/gI na powierzchni komórek infekowanych BHV-1 WT a rekombinantami. Test U Manna-Whitneya;  $p < 0,01$ . (C.) Obrazowanie 3D kompleksu gE/gI w połączeniach komórek MDBK infekowanych rekombinantami BHV-1, 12 hpi. Żółta strzałka wskazuje na lokalizację gE/gI w połączeniach komórkowych.

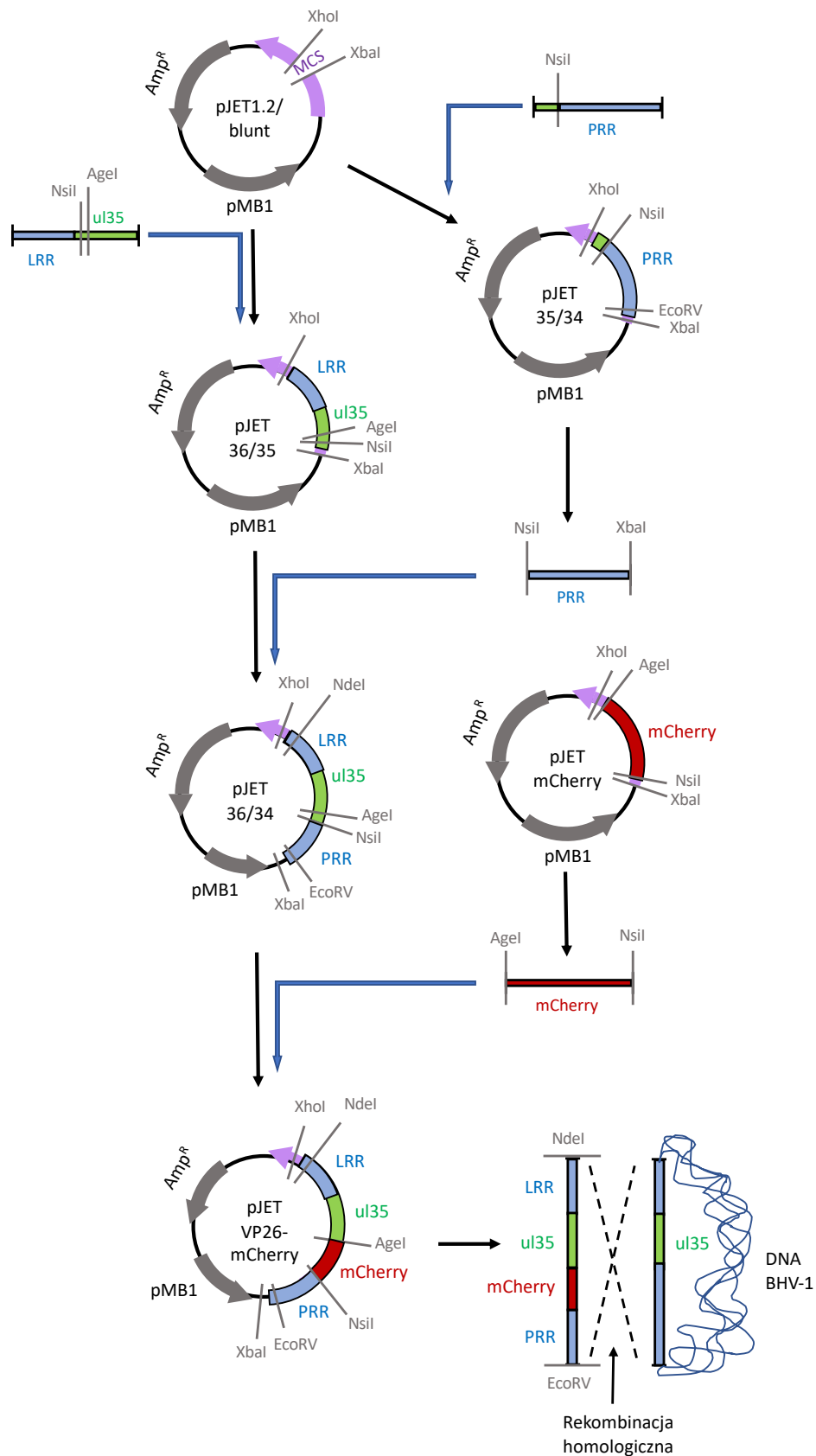
### 8.1.2 Konstrukcja fluorescencyjnych rekombinantów wirusa BHV-1 z białkiem VP26-mCherry

W celu obserwacji transmisji wirionów BHV-1 w żywych komórkach, skonstruowano rekombinanta BHV-1 VP26-mCherry oraz podwójnie fluorescencyjnego rekombinanta BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry. Jak już wspomniano w podrozdziale 4.1.2, VP26 jest małym białkiem kapsydowym (12 kDa), będącym produktem genu *ul35*. Jest ono zlokalizowane na końcach heksonów białka VP5, na zewnętrznej powierzchni ikozaedralnego kapsydu wirusa BHV-1. Białko to nie jest konieczne do namnażania wirusa w hodowli komórkowej [435]. Występuje ono w około 900 kopiach w każdym nowo powstałym kapsydie wirusowym [436], co umożliwia dobrą wizualizację rozprzestrzeniania się wirusa w zainfekowanych komórkach. Fluorofor mCherry jest pochodną monomerycznego białka czerwonej fluorescencji – mRFP. Został wybrany do konstrukcji białka fuzyjnego ze względu na to, że w porównaniu do mRFP jest on jaśniejszy, ok. 10 razy bardziej fotostabilny, szybciej dojrzewa po translacji [437] oraz wykazuje najmniejszą wśród białek czerwonej fluorescencji tendencję do formowania dimerów [381].

Rekombinanty BHV-1 VP26-mCherry oraz gE-GFP VP26-mCherry powstały na drodze homologicznej rekombinacji DNA BHV-1 WT oraz BHV-1 gE-GFP oraz tzw. kasety do kotransfekcji. Kasetę do kotransfekcji zawierała gen mCherry wklonowany w ramkę odczytu genu *ul35*, w taki sposób, by fluorescencyjna metka znalazła się na wystającym na zewnątrz kapsydu N-końcu białka VP26. Poza tym kasetę zawierała ramiona do rekombinacji homologicznej w postaci sekwencji DNA wirusowej długości ok. 1000 pz, flankujące miejsce fuzji genowej. Konstrukcję kasety przeprowadzono w wektorze plazmidowym pJET1.2/blunt (**Materiały 6.6.1**). W pierwszym etapie wyizolowano pełnej długości DNA wirusowy BHV-1 WT (**Metody 7.10**). W celu amplifikacji genu *ul35* wraz z ramionami do rekombinacji, przeprowadzono dwie oddzielne reakcje PCR przy użyciu starterów 36-FOR i 35-REV oraz 35-FOR i 34-REV (**Metody 7.11**) na matrycy DNA wirusa BHV-1 WT. Otrzymane produkty PCR następnie wklonowano do wektora pJET1.2/blunt, otrzymując wektory pJET 36/35 oraz pJET 35/34. Starter 35-REV wprowadził sekwencje DNA rozpoznawane przez endonukleazy NsiI oraz AgeI. Natomiast starter 35-FOR wprowadził sekwencję cięcia endonukleazy NsiI. W kolejnym etapie dokonano wycięcia



wstawki 35/34 z wektora, wykorzystując obecne w sekwencji wektora miejsce cięcia enzymu XbaI oraz wprowadzone na starterze 35-FOR miejsce NsiI. Wstawkę klonowano do trawionego tymi samymi enzymami wektora pJET 36/35. Otrzymano plazmid pJET 36/34 z miejscami restrykcyjnymi rozpoznawanymi przez enzymy NsiI i AgeI na końcu 5' genu *uI35*. Następnie przeprowadzono reakcję PCR genu mCherry na matrycy DNA plazmidowego wektora p-LEXY\_I-blecherry 3 (**Materiały 6.6.2**) z wykorzystaniem starterów Cherry-FOR oraz Cherry-REV. Startery użyte do tej reakcji PCR wprowadzały miejsca restrykcyjne rozpoznawane przez endonukleazy NsiI oraz AgeI. Produkt amplifikacji wklonowano do plazmidu pJET1.2/blunt, otrzymując wektor pJET-mCherry. W końcowym etapie klonowania plazmidy pJET 36/34 oraz pJET-mCherry trawiono enzymami NsiI oraz AgeI. Wstawka zawierająca gen mCherry oraz przecięty wektor pJET 36/34 zostały rozdzielone w żelu agarozowym (**Metody 7.13**) i oczyszczone (**Metody 7.14**). Następnie przeprowadzono ligację wstawki i wektora (**Metody 7.15**) otrzymując plazmid pJET VP26-mCherry. Kasetę do kotransfekcji wycięto z wektora pJET VP26-mCherry z wykorzystaniem enzymów NdeI, EcoRV oraz VspI (AseI). Poprawność sekwencji DNA na każdym etapie klonowania sprawdzono poprzez sekwencjonowanie (**Metody 7.12**). Schemat procedury konstrukcji kasety do kotransfekcji przedstawiono na **rycinie 32**.

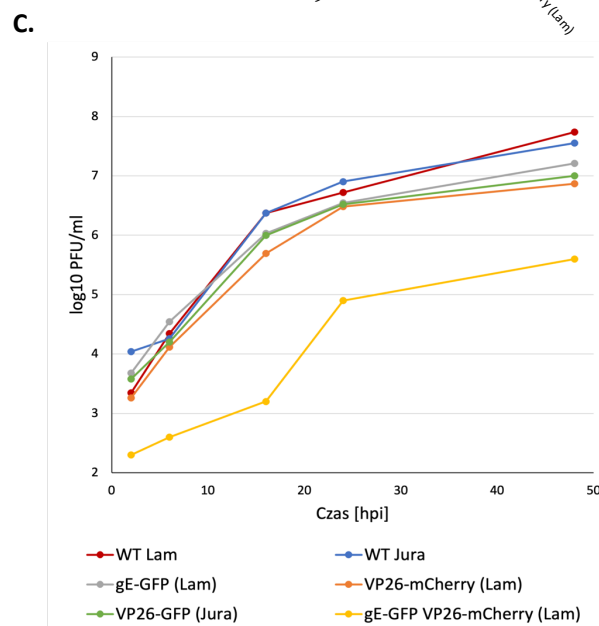
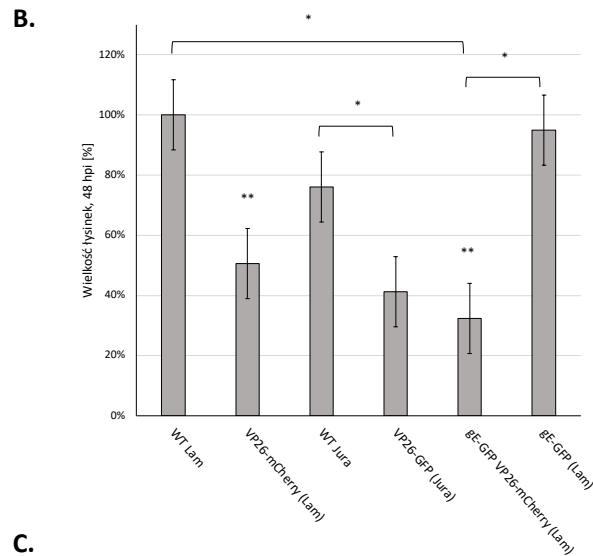
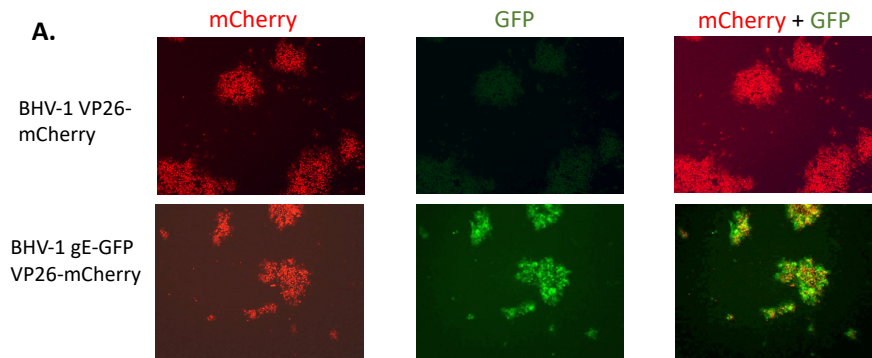


Ryc. 32: Schemat konstrukcji kasy do kotransfekcji kodującej białko fuzyjne VP26-mCherry. LRR - lewe ramię rekombinacji; MCS (z ang. *multiple cloning site*) - miejsce wielokrotnego klonowania; PRR - prawe ramię rekombinacji.

Kasetę oraz DNA BHV-1 WT lub rekombinanta BHV-1 gE-GFP wprowadzono do komórek KOP-R (**Materiały 6.1.2**) na drodze kotransfekcji metodą szoku glicerolowego (**Metody 7.20**). Inkubację prowadzono w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C, aż do pojawienia się łysek wirusowych. Izolacji rekombinantów z fuzją VP26-mCherry dokonano na podstawie czerwonej fluorescencji poprzez 5-krotne pikowanie pojedynczych łysek wirusowych (**Metody 7.21**).

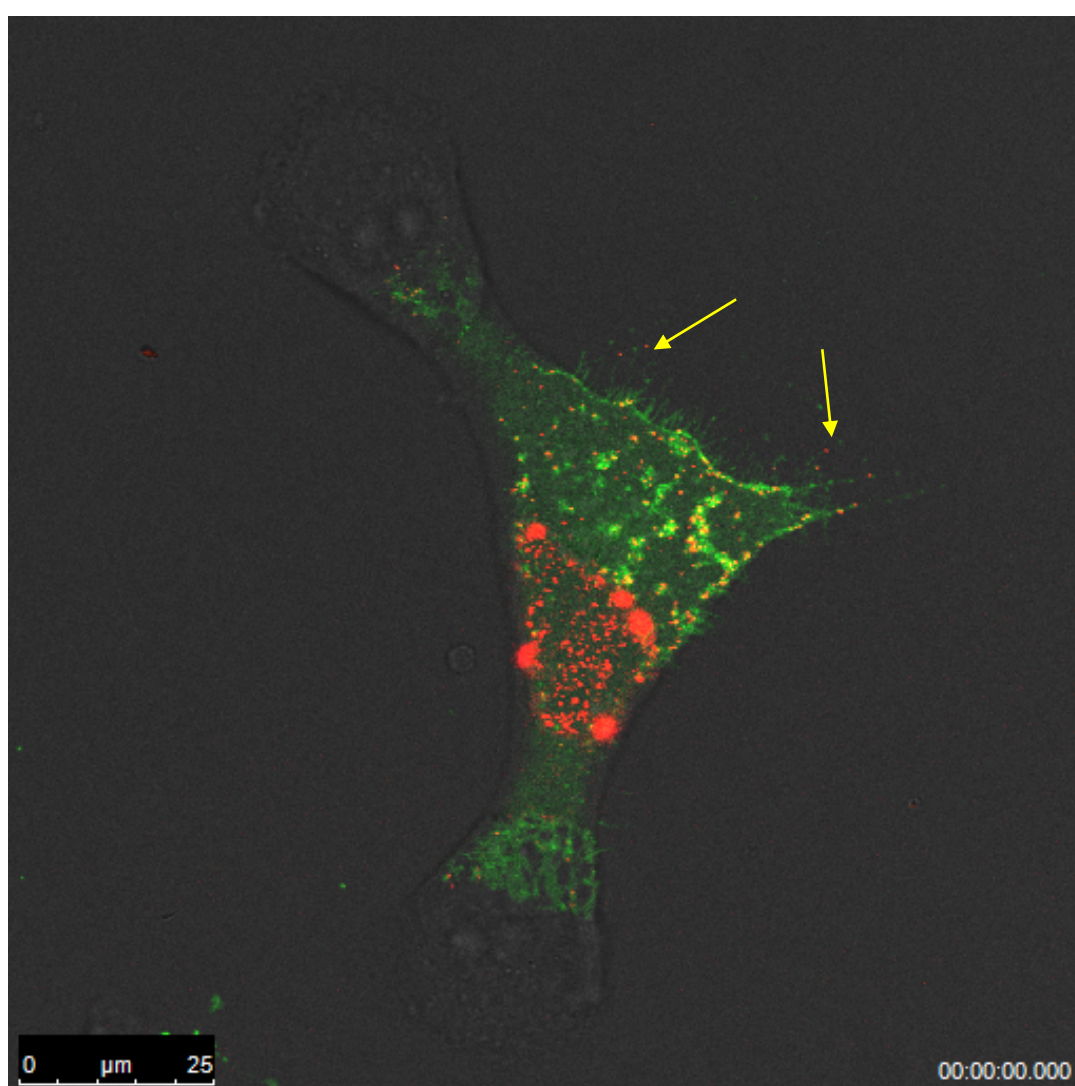
Nowo otrzymane rekombinanty scharakteryzowano poprzez test wielkości łysek wirusowych (**Metody 7.6**), sporządzenie krzywej wzrostu (**Metody 7.22**) oraz obserwacje mikroskopowe lokalizacji wewnątrzkomórkowej białek fuzyjnych (**Ryc. 33 i 34**). W teście wielkości łysek wirusowych porównano rozmiary łysek względem typu dzikiego wirusa szczepu Lam (100%), na którego matrycy skonstruowano wszystkie rekombinanty w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów MWB. Test wykonano w hodowli komórek MDBK w trzech powtórzeniach biologicznych. Fuzja białka VP26 z mCherry spowodowała znaczną redukcję rozmiaru łysek względem BHV-1 WT Lam - o ok. 50% dla BHV-1 VP26-mCherry oraz o ok. 78% dla podwójnie fluorescencyjnego BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry (**Ryc. 33 B**). Dla porównania przeprowadzono również analizę wielkości łysek rekombinanta BHV-1 VP26-GFP szczepu Jura (**Materiały 6.3.8**), który także manifestował zmniejszony o 50% średni rozmiar łysek względem BHV-1 WT Jura (**Materiały 6.3.9**).

Analizę krzywej wzrostu wykonano w hodowli komórek MDBK w trzech powtórzeniach biologicznych (**Ryc. 33 C**). Rekombinant BHV-1 VP26-mCherry wykazywał ok. 10-krotny spadek miana względem BHV-1 WT Lam. Podobny wynik otrzymano również w porównaniu krzywej dla BHV-1 VP26-GFP i BHV-1 WT Jura. W przypadku rekombinanta BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry wykryto 100-krotny spadek miana względem BHV-1 WT Lam. Zarówno spadek miana jak i zmniejszony średni rozmiar łysek wirusowych są charakterystyczne dla rekombinantów niosących fuzję VP26 z białkami fluorescencyjnymi [381].



**Ryc. 33: Charakterystyka rekombinantów BHV-1 VP26-mCherry oraz gE-GFP VP26-mCherry.** (A.) Morfologia łyśinek rekombinantów w hodowli komórek MDBK. Czerowony: VP26-mCherry; zielony: gE-GFP. Zdjęcia wykonano w mikroskopie fluorescencyjnym przy użyciu obiektywu 10x. (B.) Test wielkości łyśinek wirusowych. Słupki błędów oznaczają odchylenia standardowe. [\*] istotna statystycznie różnica między wielkością łyśinek wirusowych objętych klamrą; \*\* istotna statystycznie różnica w wielkości łyśinek rekombinantów VP26-mCherry i gE-GFP VP26-mCherry. Test U Manna-Whitneya;  $p < 0,01$ . (C.) Krzywa wzrostu BHV-1 WT i rekombinantów. Wykresy B. i C. przedstawiają wartości uśrednione z trzech powtórzeń biologicznych eksperymentu.

Obserwacje mikroskopowe (**Ryc. 34, Film 11**) z wykorzystaniem analizy przyżyciowej potwierdziły właściwą lokalizację białek fuzyjnych w komórkach MDBK. Białko gE-GFP lokalizowało w błonie komórkowej oraz aparacie Golgiego. Białko VP26-mCherry było widoczne w jądrze w formie dynamicznie poruszających się czerwonych kapsydów wirusowych, jak również jako duże agregaty, charakterystyczne dla rekombinantów niosących fuzję VP26 z białkiem fluorescencyjnym [438]. Poza tym zaobserwowano pojedyncze kapsydy (czerwone punkty) oraz kapsydy opłaszczone osłonką (żółte punkty) w cytoplazmie. Dodatkowo punkty żółte, zielone i czerwone były widoczne w cienkich połączeniach adhezyjnych komórki.

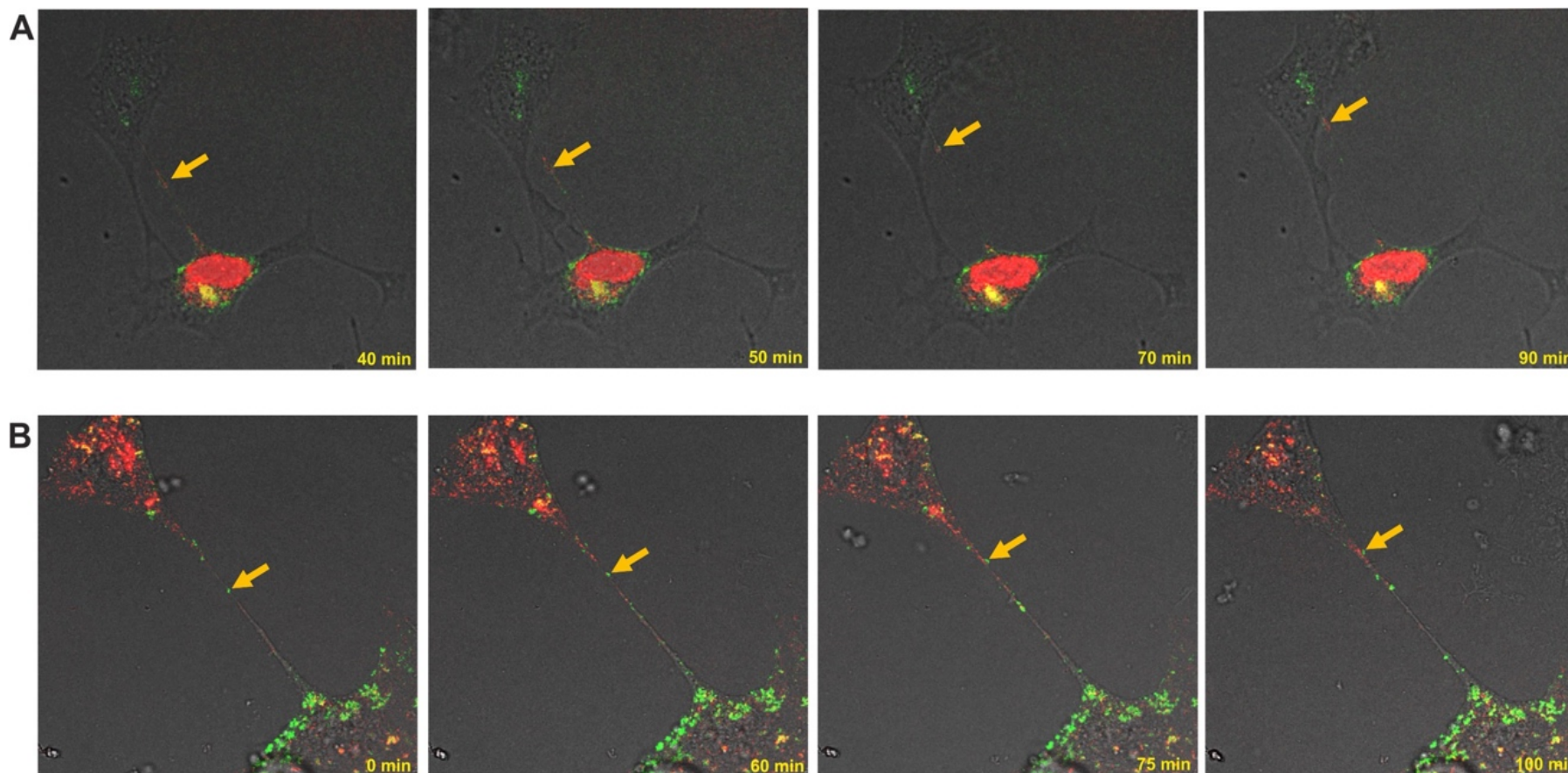


**Ryc. 34: Obrazowanie przyżyciowe infekcji BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry w pojedynczej komórce linii MDBK.** Na przykładowym zdjęciu widoczna lokalizacja jądrowa nowo składanych kapsydów wirusowych, lokalizacja gE-GFP w błonie komórkowej oraz pojedyncze wiriony w cytoplazmie (żółte punkty) i w cienkich połączeniach adhezyjnych (żółte strzałki) Czerwony: VP26-mCherry; zielony: gE-GFP. Obrazy zbierano co 12 s, przy użyciu obiektywu 63x. Dodatkowe materiały: film 6.

### **8.1.3 Analiza przyżyciowa rozprzestrzeniania się rekombinanta BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry w międzykomórkowych nanorurkach (TNT)**

Rekombinant BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry oraz metoda długotrwałej obserwacji transmisji wirusa zostały wykorzystane do analizy CTC za pośrednictwem międzykomórkowych nanorurek. Analizę przeprowadzono w środowisku przeciwciał neutralizujących w komórkach KOP-R oraz pierwotnych fibroblastach bydłęcych. Właściwa ilość surowicy do neutralizacji wirusa zewnątrzkomórkowego (PRNT<sub>98</sub>) w hodowli komórek KOP-R została zoptymalizowana za pośrednictwem testu opisanego w podrozdziale **8.1.1.1** i wynosiła 160 µl. Obserwacje rozpoczęto po 12 hpi w hodowli bydłęcych fibroblastów i 24 hpi w przypadku wolno proliferujących komórek KOP-R. Obraz zbierano co 10-19 s przez 10 h.

W obu typach komórek zaobserwowano dynamiczny ruch wyznakowanych fluorescencyjnie białek wirusowych zarówno wewnątrz komórki jak i w połączeniach komórkowych. W trakcie eksperymentu zaobserwowano również transfer białek VP26-mCherry oraz gE-GFP w międzykomórkowych nanorurkach łączących ze sobą komórkę zainfekowaną i niezainfekowaną. Transmisja białek wirusowych wewnątrz TNT zachodziła zwykle w obu kierunkach z cyrkulacją pojedynczych cząsteczek. Przykładowe obrazy z filmów poklatkowych przedstawiono na **Ryc. 35**. Wyniki powyższej obserwacji zostały opublikowane w artykule Panasiuk i wsp. 2018 [172] oraz były częścią pracy doktorskiej dr Mirosławy Panasiuk [370].



**Ryc. 35: Transmisja rekombinanta BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry poprzez TNT w komórkach linni KOP-R (A.) oraz pierwotnych fibroblastach bydłęcych (B.).** Przykładowe obrazy z filmu poklatkowego pokazują fluorescencyjne białka wirusowe przemieszczające się wewnątrz TNT (żółte strzałki) w środowisku przeciwciał neutralizujących wirusa zewnątrzkomórkowego. Czerwony: kapsydy wirusowe (VP26-mCherry); zielony: glikoproteina gE-GFP. Obrazy zbierano co 10-19 s, przy użyciu obiektywu 63x. Dodatkowe materiały: filmy 7 i 8.

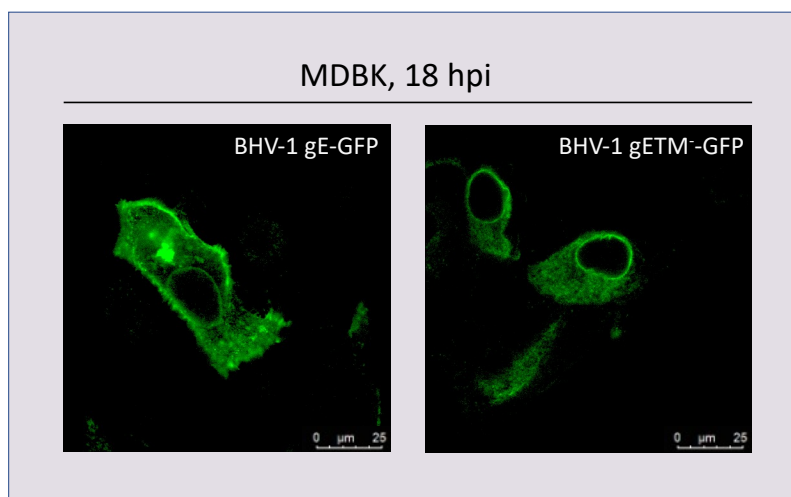
## 8.2 Badanie oddziaływania kompleksu gE/gI z białkami komórkowymi w procesie transmisji wirusa BHV-1 na drodze CTC

W tym etapie pracy badawczej podjęto próbę identyfikacji czynników komórkowych oddziałujących z kompleksem gE/gI wirusa BHV-1 w transmisji na drodze CTC. Potencjalnych partnerów komórkowych gE/gI zidentyfikowano przy pomocy spektrometrii masowej z wykorzystaniem metody potrójnego znakowania izotopowego (z ang. *Triple SILAC*), dalej zwanego potrójnym SILAC. Do tej analizy wykorzystano fluorescencyjne rekombinanty BHV-1 gE-GFP oraz BHV-1 gETM<sup>-</sup>-GFP. Eksperyment przeprowadzono w hodowli komórek MDBK. Fuzja z białkiem GFP umożliwiła monitorowanie lokalizacji glikoproteiny gE w zainfekowanych komórkach, tak by precyzyjnie określić czas, w którym kompleks zostanie translokowany do połączeń komórkowych i będzie możliwa interakcja z jego partnerami komórkowymi. Rekombinant gETM<sup>-</sup>-GFP posłużył jako kontrola ze względu na brak lokalizacji błonowej kompleksu gETM<sup>-</sup>/gI, co potencjalnie wykluczało możliwość interakcji z białkami komórkowymi zaangażowanymi w CTC. Dodatkową kontrolą były komórki nieinfekowane. Ponadto białko GFP posłużyło jako metka do koimmunoprecypitacji w strategii wzbogacania podczas przygotowania próbek do analizy w spektrometrze masowym.

### 8.2.1 Optymalizacja warunków infekcji oraz lizy komórek w celu przygotowania próbek do analizy w spektrometrze masowym

Przed przeprowadzeniem potrójnego SILAC, w pierwszej kolejności zoptymalizowano warunki infekcji oraz lizy komórek. Komórki MDBK infekowano rekombinantem BHV-1 gE-GFP w MOI=1. Po 1 h od infekcji zbierano inokulum, a następnie prowadzono inkubację do momentu translokacji gE-GFP do połączeń komórkowych. Po 18 h od infekcji, komórki wciąż przylegały do powierzchni naczynia oraz potwierdzono obecność dużej ilości gE-GFP w połączeniach komórkowych (**Ryc. 36**).

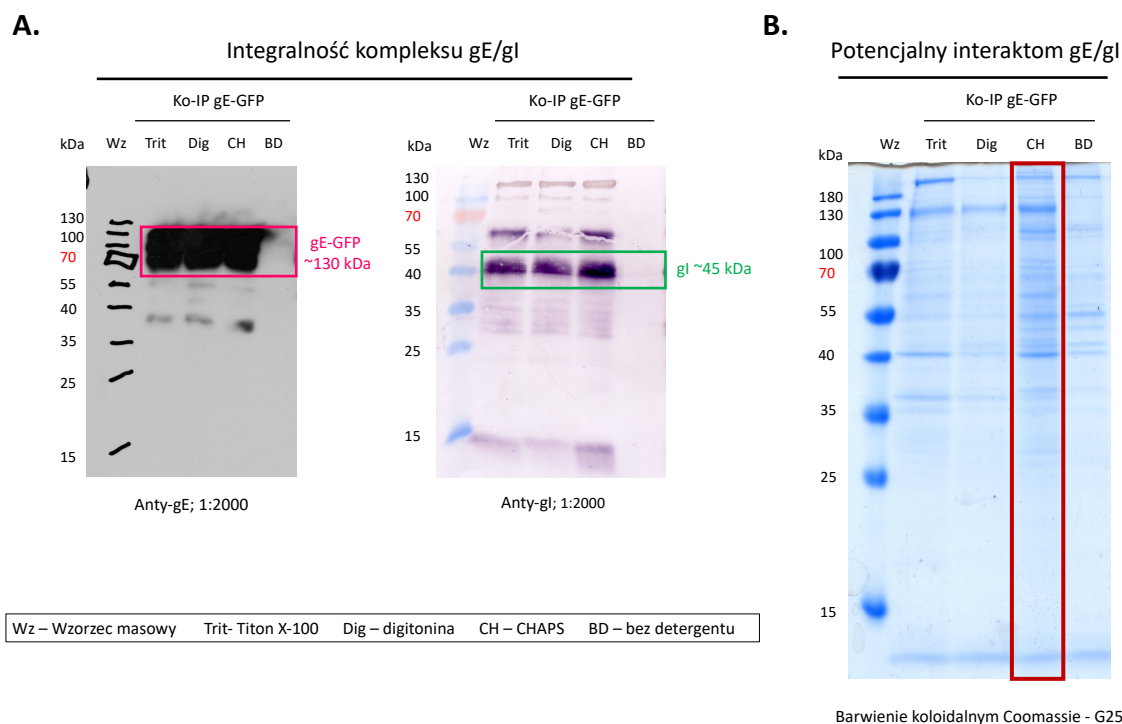




**Ryc. 36: Lokalizacja wewnątrzkomórkowa gE-GFP po 18 hpi.** Przykładowe zdjęcia komórek MDBK infekowanych rekombinantami BHV-1 gE-GFP oraz BHV-1 gETM<sup>-</sup>-GFP. Zielony: gE-GFP oraz gETM<sup>-</sup>-GFP. Zdjęcia wykonano przy użyciu obiektywu 63x.

Następnie przeprowadzono optymalizację właściwego detergentu do lizy komórek, tak by zapewnić integralność kompleksu gE/gI przy jednoczesnej koimmunoprecypitacji jak największej ilości białek potencjalnego interaktomu. W tym celu przetestowano trzy detergenty - CHAPS, digitoninę lub Triton-X-100 (**Materiały 6.12.11-6.12.13**). Powyższe detergenty zostały wybrane ze względu na fakt, iż są surfaktantami używanymi do solubilizacji receptorów błonowych przy jednoczesnym zachowaniu ich natywnej konformacji. Lizę prowadzono przez 30 min, w temperaturze +4°C, w obecności inhibitorów proteaz (**Metody 7.23**). W kolejnym etapie lizaty poddano koimmunoprecypitacji na kulkach magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami anti-GFP (**Metody 7.24**). Następnie próbki rozdzielano w 15% żelu poliakrylamidowym (**Metody 7.25**). W celu określenia rodzaju detergentu, który umożliwił precypitację największej ilości białek stanowiących potencjalny interaktom gE/gI, żel barwiono po rozdziale elektroforetycznym błękitem Coomassie Brilliant Blue G-250 (**Metody 7.26**). By potwierdzić integralność kompleksu gE/gI po lizie i koimmunoprecypitacji, przeprowadzono Western Blotting (**Metody 7.28**) z wykorzystaniem przeciwciał anti-gE (**Materiały 6.4.5**) oraz anti-gI (**Materiały 6.4.6**).

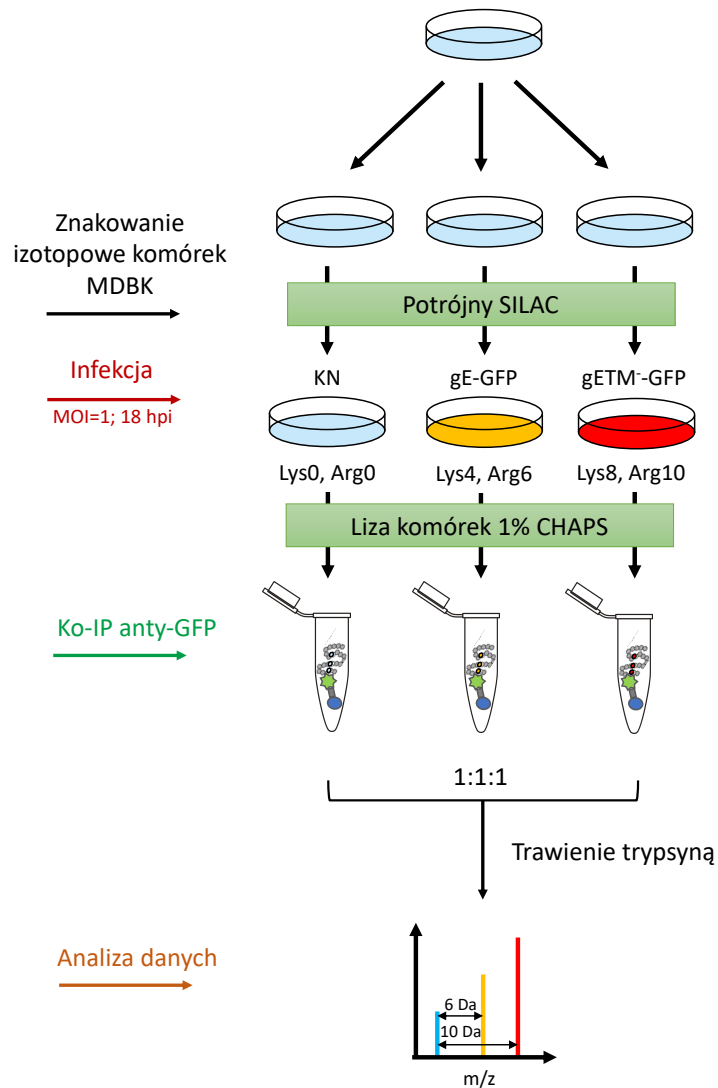
Integralność kompleksu gE/gI została zachowana przy użyciu wszystkich trzech detergentów (**Ryc. 37A**). Ze względu na ilość koprecypitowanych białek, do dalszych eksperymentów wybrano bufor do lizy z 1% CHAPS (**Ryc. 37B**).



**Ryc. 37: Wybór detergentu do lizy komórek przed koimmunoprecypitacją.** Komórki MDBK infekowane wirusem BHV-1 gE-GFP poddano lizie i koimmunoprecypitacji na kulkach magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami anti-GFP (A.) Potwierdzenie integralności kompleksu gE/gI metodą Western Blotting. Immunodetekcja z wykorzystaniem przeciwciał mysich monoklonalnych anti-gE (Mab3), surowicy króliczej anti-gI oraz przeciwciał drugorzędowych anti-mysich sprzężonych z HRP lub anti-króliczych sprzężonych z AP. (B.) Ocena ilości białek stanowiących potencjalny interaktom gE/gI po koimmunoprecypitacji. Barwienie żelu poliakrylamidowego koloidalnym Coomassie Brilliant Blue G-250. Różowa ramka - gE-GFP; zielona ramka - dojrzała forma gI; czerwona ramka - barwienie białek po lizie buforem z 1% CHAPS; Ko-IP - koimmunoprecypitacja.

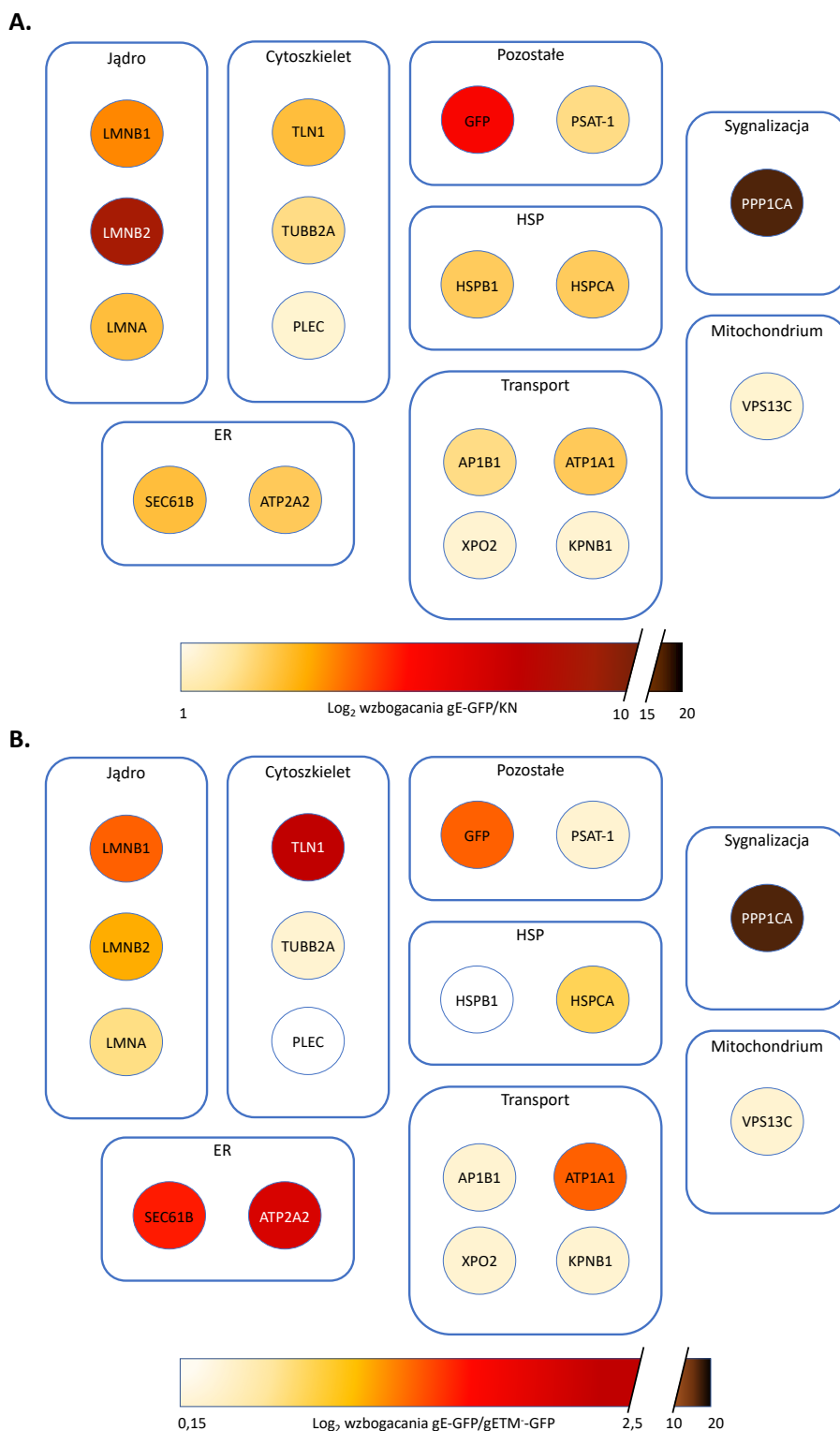
### 8.2.2 Identyfikacja potencjalnych partnerów komórkowych kompleksu gE/gI w spektrometrze masowym.

By zidentyfikować białka stanowiące potencjalny interaktom kompleksu gE/gI w procesie CTC, przeprowadzono potrójny SILAC (**Metody 7.29**). Komórki MDBK hodowano przez sześć pasażów w pożywce zawierającej reszty argininy oraz lizyny o „lekkim”, „średnim” lub „ciężkim” piętnie. Nie stwierdzono różnic w żywotności komórek pomiędzy stosowanymi piętnami aminokwasów. Po znakowaniu izotopowym przygotowano próbki do analizy w spektrometrze masowym (**Metody 7.30**). Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych ze zmianą piętna (**Tab. 7**). **Rycina 38** przedstawia schemat procedury przygotowania próbek.



**Ryc. 38: Schemat procedury przygotowania próbek do analizy w spektrometrze masowym.** Komórki MDBK znakowano izotopowo metodą potrójnego SILAC. Następnie infekowano rekombinantami BHV-1 gE-GFP oraz BHV-1 gETM<sup>-</sup>-GFP, w MOI=1. Po 18 hpi komórki lizowano, poddawano koimmunoprecypitacji i analizowano w spektrometrze masowym. KN - komórki nieinfekowane, m – masa, z – ładunek.

Analizę proteomiczną przeprowadzono przy współpracy z Pathoproteomics Reserch Group (Uniwersytet Ernst Moritz Arndt, Greiswald, Niemcy), za pomocą spektrometru masowego LTQ Orbitrap Velos (**Metody 7.31**). Uśrednione wartości z trzech powtórzeń eksperymentu przedstawiono w skali  $\log_2$  jako stosunek wzbogacania białek koprecypitujących z gE-GFP do komórek nieinfekowanych (**Ryc. 39 A**) oraz jako stosunek wzbogacania gE-GFP do gETM<sup>-</sup>-GFP (**Ryc. 39 B**). Na podstawie uzyskanych danych zidentyfikowano 17 białek będących potencjalnymi partnerami komórkowymi kompleksu gE/gI oraz metkę GFP. W **tabeli 10** zestawiono informacje dotyczące ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej, funkcji w komórce oraz związku z infekcją alfa herpeswirusową.



**Ryc. 39: Potencjalni partnerzy komórkowi gE-GFP, 18 hpi.** Białka stanowiące potencjalny interaktom zostały podzielone na kategorie pod względem lokalizacji komórkowej lub funkcji. (A.) Stosunek wzbogacania  $\log_2$  białek koprecypitujących z gE-GFP do komórek nieinfekowanych (KN). (B.) Stosunek wzbogacania  $\log_2$  białek koprecypitujących z gE-GFP do gETM<sup>-</sup>-GFP. Potencjalnym partnerom gE-GFP przypisano barwę w zależności od stosunku wzbogacania. Większe natężenie koloru oznaczało większą ilość białek koprecypitujących z gE-GFP w porównaniu do KN lub gETM<sup>-</sup>-GFP. Wewnątrz kół podano nazwy skróty genów kodujących białka interaktomu. HSP (z ang. *heat-shock proteins*) - białka szoku termicznego.

**Tab. 10: Charakterystyka białek potencjalnego interaktomu gE.** Opis funkcji zidentyfikowanych białek pochodzi z bazy UniProt.  $\alpha$ -HV- alfaherpeswirus; B- błona komórkowa; C - cytoplazma; CS - cytoszkielet; EN - endosomy; ER - retikulum endoplazmatyczne; G - aparat Golgiego; J - jądro; M - mitochondrium.

Białko	Gen	UniProt ID	Lokalizacja wewnątrzkomórkowa								Funkcja w komórce	Związek z infekcją $\alpha$ -HV	
			J	M	B	ER	EN	C	G	CS			
PP1 $\alpha$	PPP1CA	Q3T0E7	✓		✓				✓			Defosforylacja Ser/Thr Adhezja komórek	[429], [439], [440]
Talina 1	TLN1	F1MDH3			✓				✓		✓	Adhezja komórek	[424], [441]
SERCA2	ATP2A2	Q5MA64			✓	✓						Transport Ca <sup>2+</sup> Adhezja komórek	[442], [417], [243]
Sec61 $\beta$	SEC61B	Q2NKT5				✓						Transport wewnątrzkomórkowy	-----
ATPaza Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> $\alpha$ -1	ATP1A1	F1MI32			✓							Transport Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	[443], [444]
Lamina B1	LMNB1	A7YY47	✓									Organizacja błony jądrowej	[445], [446]
Lamina B2	LMNB2	F1MJI7	✓									Organizacja błony jądrowej	[447], [448]
HSP 90- $\alpha$	HSPCA	Q3T00							✓			Fałdowanie białek	[449], [450]
Lamina A/C	LMNA	Q3SZI2	✓									Organizacja błony jądrowej Naprawa DNA Organizacja chromatyny	[445]–[448]
Karioferyna $\beta$ -1	KPNB1	E1BFV0	✓						✓			Transport jądrowo- cytoplazmatyczny	[417], [243], [451]–[453]
$\beta$ -adaptyna 1	AP1B1	Q2KJB2					✓	✓	✓			Transport wewnątrzkomórkowy Transport pęcherzykowy	-----
PSAT	PSAT-1	A6QR28							✓			Synteza L-seryny	-----
$\beta$ -tubulina-2A	TUBB2A	Q148E2							✓		✓	Budowa cytoszkieletu	[454]–[456]
Eksportyna-2	CSE1L	Q58DL4	✓						✓			Transport wewnątrzkomórkowy	-----
VPS13C	VPS13C	E1BPX1		✓					✓			Organizacja mitochondriów Sortowanie białek do wakuoli	-----
HSP $\beta$ -1	HSPB1	E9RHW1	✓		✓				✓		✓	Fałdowanie białek Transport aksoplazmatyczny	[457], [458]
Plektyna	PLEC	E1BF59			✓				✓		✓	Budowa cytoszkieletu	[243]

W poszukiwaniu potencjalnych partnerów kompleksu gE/gI w transmisji wirusa BHV-1 na drodze CTC, najważniejszym wynikiem była identyfikacja sześciu białek zlokalizowanych w błonie komórkowej - podjednostki katalitycznej  $\alpha$  białkowej fosfatazy 1 (PP1 $\alpha$ ), taliny 1, pompy wapniowej 2 (SERCA2), podjednostki  $\alpha$ -1 ATPazy Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, białka szoku termicznego  $\beta$ -1 oraz plektyny. Spośród tych białek największy stosunek wzbogacania log<sub>2</sub> gE-GFP/KN oraz log<sub>2</sub> gE-GFP/gETM<sup>-</sup>-GFP zaobserwowano dla PP1 $\alpha$ . Oznacza to, że fosfataza PP1 $\alpha$  koprecypitowała jedynie z białkiem gE-GFP pełnej długości, a nie z jego skróconą formą. W przypadku pozostałych białek interaktomu stosunek wzbogacania log<sub>2</sub> gE-GFP/gETM<sup>-</sup>-GFP miał znacznie niższe wartości. Istotne statystycznie różnice wykazano dla taliny 1, SERCA2, podjednostki  $\beta$  białka transportowego Sec61, ATPazy Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>  $\alpha$ -1, laminy B1 oraz laminy B2. Reszta zidentyfikowanych białek oddziaływała w podobnym stopniu z gE-GFP jak i gETM<sup>-</sup>-GFP.

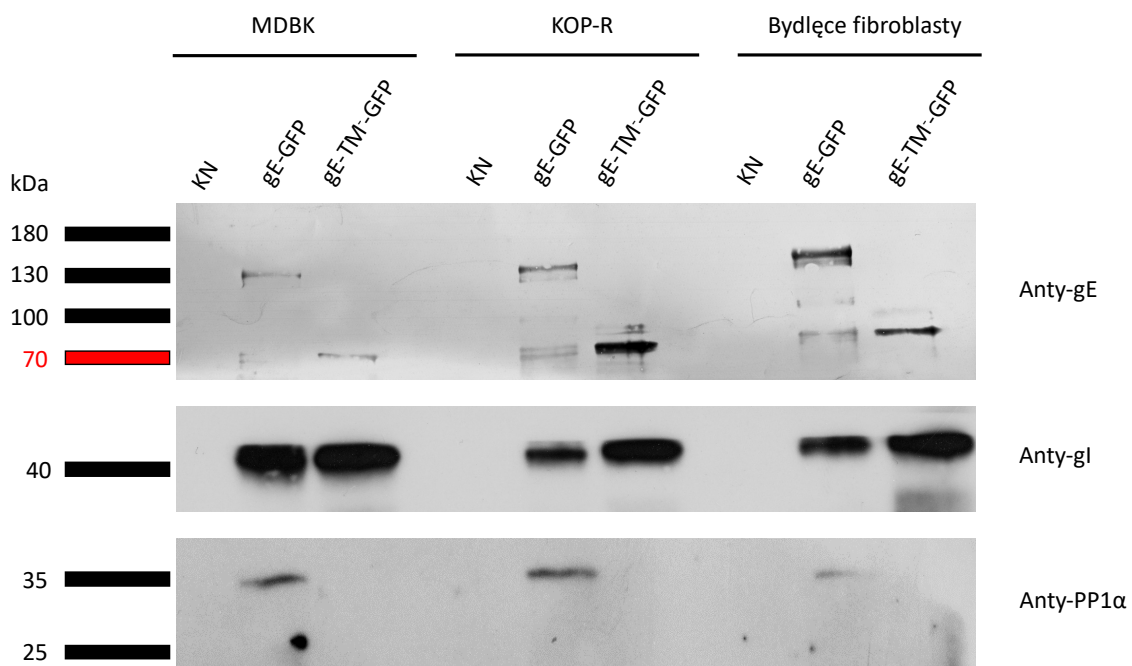
W dalszej części pracy doktorskiej, ze względu na najwyższą wartość stosunku wzbogacania, skupiono się na analizie oddziaływania kompleksu gE/gI z fosfatazą PP1 $\alpha$ .

### **8.2.3 Analiza interakcji kompleksu gE/gI z podjednostką katalityczną białkowej fosfatazy 1 $\alpha$ (PP1 $\alpha$ ).**

W tej części pracy badawczej potwierdzono oddziaływanie gE-GFP z PP1 $\alpha$  w trzech typach komórek bydłych. W kolejnym etapie przeprowadzono analizę interakcji białkowych gE-GFP oraz PP1 $\alpha$  w punktach czasowych od infekcji. Powyższa analiza miała na celu przyniesienie odpowiedzi na pytanie, czy interakcja gE-GFP-PP1 $\alpha$  zachodzi, gdy glikoproteina gE zlokalizowana jest w połączeniach komórkowych czy może na wcześniejszym etapie infekcji. Następnie przeanalizowano możliwość bezpośredniej interakcji gE-PP1 $\alpha$  w systemie dwuhybrydowym F2H poprzez transfekcję komórek F2H<sup>®</sup>-BHK wektorami plazmidowymi, kodującymi fluorescencyjne pochodne tych białek.

### 8.2.3.1 Potwierdzenie oddziaływania gE-GFP z PP1 $\alpha$ w trzech typach komórek bydlęcych

W celu potwierdzenia wyników otrzymanych w spektrometrze masowym, przeprowadzono Western Blotting próbek zawierających białka koimmunoprecypitujące z gE-GFP oraz gETM<sup>-</sup>-GFP. Analizę wykonano w trzech liniach komórkowych - MDBK, KOP-R oraz pierwotnych fibroblastach bydlęcych. Komórki infekowano rekombinantami BHV-1 gE-GFP oraz BHV-1 gETM<sup>-</sup>-GFP, w MOI=1. Podobnie jak przy przygotowaniu próbek do analizy w spektrometrze masowym, po 18 hpi przeprowadzono lizę buforem z 1% CHAPS oraz koimmunoprecypitację na kulkach magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami anty-GFP (**Metody 7.24**). Następnie próbki rozdzielano w 15% żelu poliakrylamidowym (**Metody 7.25**) i analizowano metodą Western Blotting (**Metody 7.28**) z przeciwciałami skierowanymi przeciwko gE, gI oraz PP1 $\alpha$  (**Materiały 6.4.7**). We wszystkich trzech liniach komórkowych potwierdzono koimmunoprecypitację fosfatazy PP1 $\alpha$  z gE-GFP. W przypadku gETM<sup>-</sup>-GFP, nie wykryto interakcji z PP1 $\alpha$  we wszystkich typach analizowanych komórek (**Ryc. 40**).

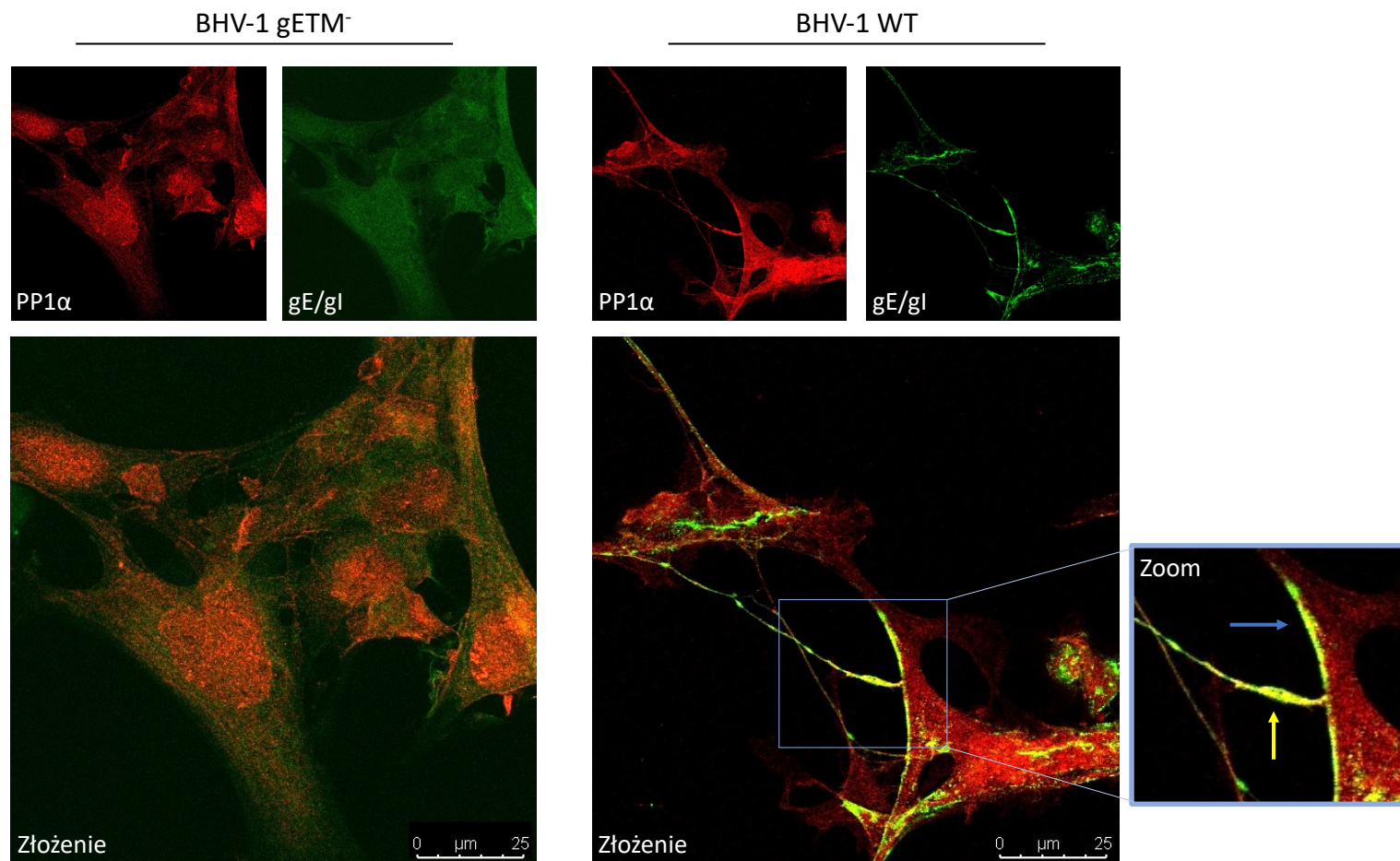


**Ryc. 40: Potwierdzenie oddziaływania gE-GFP z PP1 $\alpha$  w trzech typach komórek bydlęcych.** Komórki MDBK, KOP-R oraz bydlęce fibroblasty infekowano rekombinantami BHV-1 gE-GFP oraz BHV-1 gETM<sup>-</sup>-GFP, MOI=1. Po 18 hpi przeprowadzono lizę, koimmunoprecypitację na kulkach magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami anty-GFP oraz Western Blotting. Immunodetekcja z wykorzystaniem przeciwciał mysich monoklonalnych anty-gE, surowicy króliczej anty-gI, przeciwciał króliczych anty-PP1 $\alpha$  oraz przeciwciał drugorzędowych anty-mysich sprzężonych z AP lub anty-króliczych z HRP. MW PP1 $\alpha$ - ok. 37 kDa. KN - komórki nieinfekowane.

### 8.2.3.2 Lokalizacja wewnątrzkomórkowa kompleksu gE/gI oraz PP1 $\alpha$

W celu ustalenia, czy PP1 $\alpha$  oddziałuje z kompleksem gE/gI w obrębie połączeń komórkowych, przeprowadzono analizę mikroskopową lokalizacji wewnątrzkomórkowej powyższych białek (**Ryc. 41**). Pierwotne fibroblasty bydłęce infekowano rekombinantami BHV-1 WT oraz BHV-1 gETM<sup>-</sup> w MOI=1. Po 18 hpi komórki utrwalono i barwiono immunofluorescencyjnie z wykorzystaniem przeciwciał anti-gE/gI (zielony) oraz przeciwciał anti-PP1 $\alpha$  (czerwony). W fibroblastach infekowanych rekombinantem BHV-1 gE-GFP zaobserwowano kolokalizację kompleksu gE/gI oraz PP1 $\alpha$  w błonie komórkowej oraz w strukturze przypominającej gondolę w obrębie połączenia typu TNT. Na tym etapie infekcji nie stwierdzono kolokalizacji kompleksu oraz fosfatazy w obrębie innych struktur komórkowych, tj. aparatu Golgiego czy cytoplazmy. W przypadku komórek infekowanych BHV-1 gETM<sup>-</sup>, kompleks glikoprotein zlokalizowany był w cytoplazmie, co jest charakterystyczne dla tego rekombinanta. Natomiast lokalizacja wewnątrzkomórkowa PP1 $\alpha$  nie różniła się od tej w komórkach infekowanych BHV-1 WT, z tym że nie zaobserwowano struktur przypominających gondole w połączeniach typu TNT. Wyniki powyższego eksperymentu sugerują, że PP1 $\alpha$  może oddziaływać z kompleksem gE/gI w obrębie połączeń komórkowych.

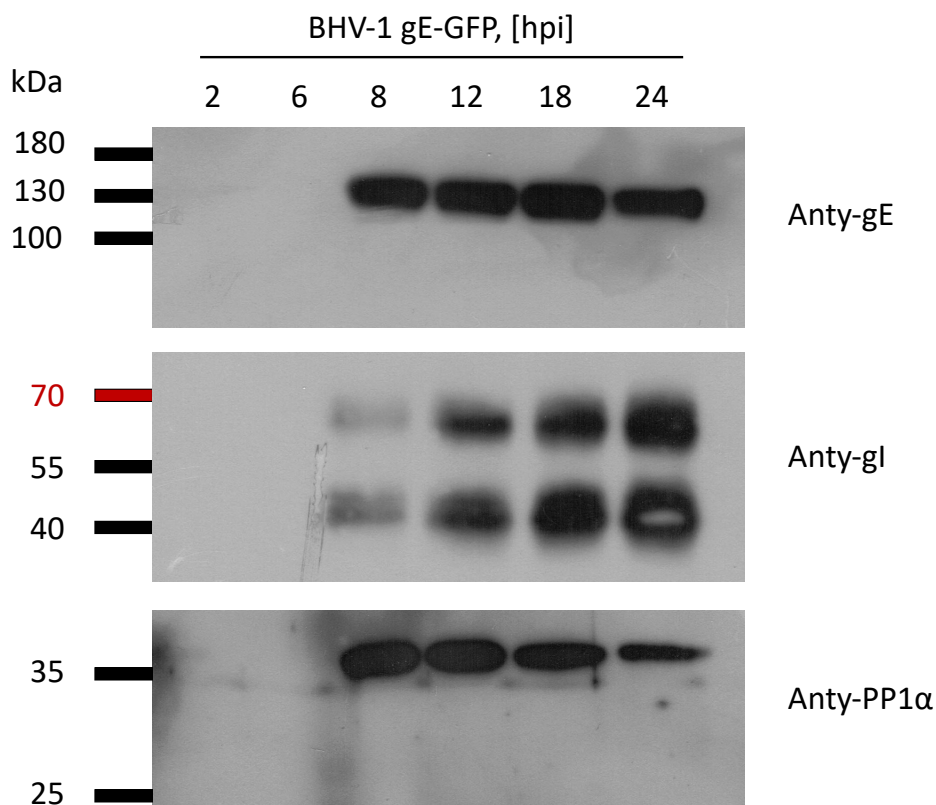




**Ryc. 41: Analiza lokalizacji wewnątrzkomórkowej kompleksu gE/gI oraz PP1α.** Fibroblasty bydłące infekowano BHV-1 WT oraz BHV-1 gETM<sup>-</sup>. Po 18 hpi komórki utrwalono i barwiono immunofluorescencyjnie. Immunodetekcja z wykorzystaniem przeciwciał mysich monoklonalnych anti-gE/gI, przeciwciał króliczych anti-PP1α oraz przeciwciał drugorzędowych anti-mysich sprzężonych z barwnikiem Alexa 488 i anti-króliczych sprzężonych z barwnikiem Alexa 546. Zdjęcia wykonano przy użyciu obiektywu 63x. Niebieska ramka – obszar zbliżony (zoom); niebieska strzałka wskazuje na kolokalizację gE/gI oraz PP1α w błonie komórkowej; żółta strzałka wskazuje na kolokalizację gE/gI oraz PP1α w TNT.

### 8.2.3.3 Analiza interakcji gE-GFP z PP1 $\alpha$ w punktach czasowych od infekcji

Aby zbadać na jakim etapie infekcji dochodzi do oddziaływania gE oraz PP1 $\alpha$ , przeprowadzono analizę interakcji w sześciu punktach czasowych od infekcji - 2, 6, 8, 12, 18 i 24 hpi (**Metody 7.32**). Powyższe punkty czasowe zostały wybrane ze względu na zmieniającą się w czasie lokalizację glikoproteiny gE. Początek sygnału fluorescencyjnego w komórkach infekowanych BHV-1 gE-GFP jest widoczny w aparacie Golgiego ok. 6-8 hpi. Po ok. 12 hpi następuje translokacja gE-GFP do połączeń komórkowych. Ok. 18 hpi następuje intensyfikacja sygnału fluorescencyjnego gE-GFP w połączeniach komórkowych. Po 24 hpi zmienia się morfologia komórek (stają się zaokrąglone) i większość z nich dysocjuje od podłoża. Próbki przygotowano podobnie jak do analizy w spektrometrze masowym. Komórki MDBK infekowano rekombinantem BHV-1 gE-GFP w MOI=1. Następnie po upływie danego czasu od infekcji komórki lizowano, poddawano koimmunoprecypitacji na kulkach magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami anti-GFP i przeprowadzano immunodetekcję przeciwciałami anti-PP1 $\alpha$ , anti-gE oraz anti-gI (**Ryc. 42**). Analiza metodą Western Blotting potwierdziła koimmunoprecypitację gE-GFP i PP1 $\alpha$  już w 8 hpi, czyli od momentu produkcji gE-GFP w zainfekowanych komórkach. Wyniki powyższego eksperymentu świadczą o interakcji białkowej z PP1 $\alpha$  przed translokacją gE-GFP do połączeń komórkowych.

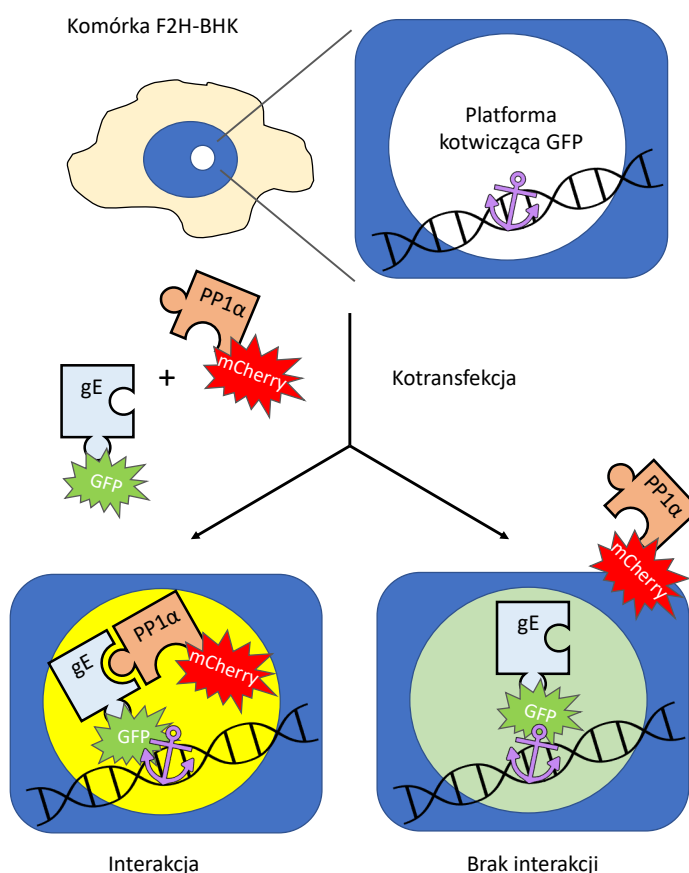


**Ryc. 42: Oddziaływanie gE-GFP i PP1 $\alpha$  w punktach czasowych po infekcji.** Komórki MDBK infekowano rekombinantem BHV-1 gE-GFP. Po 2, 6, 12, 18 i 24 hpi przeprowadzono lizę, koimmunoprecypitację na kulkach magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami anti-GFP oraz Western Blotting. Immunodetekcja z wykorzystaniem przeciwciał mysich monoklonalnych anti-gE, surowicy króliczej anti-gI, przeciwciał króliczych anti-PP1 $\alpha$  oraz przeciwciał drugorzędowych anti-mysich lub anti-króliczych z HRP. Białko PP1 $\alpha$  koimmunoprecypitowało z gE-GFP po 8 hpi.

#### 8.2.3.4 Badanie bezpośredniej interakcji gE z PP1 $\alpha$

By ustalić, czy glikoproteina gE oddziałuje bezpośrednio z PP1 $\alpha$ , przeprowadzono analizę w układzie izolowanym, poza kontekstem infekcji wirusowej. Do eksperymentu wykorzystano komercyjny system do badania interakcji białkowych F2H Assay Kit, Chromotek (**Materiały 6.14.10**). System F2H pozwala na zobrazowanie interakcji białek znakowanych fluorescencyjnie bezpośrednio w żywych komórkach. Procedura polega na kotransfekcji wektorów plazmidowych kodujących potencjalnie oddziałujące ze sobą białka w fuzji z białkami fluorescencyjnymi do specjalnie modyfikowanej linii komórek F2H<sup>®</sup>-BHK (**Ryc. 43**). Komórki F2H<sup>®</sup>-BHK posiadają platformę kotwiczącą GFP w jądrze komórkowym. Rekombinowane białko w fuzji z GFP stanowi tzw. „przynętę” a białko w fuzji z RFP (lub jego pochodnymi) „ofiara”. Po kotransfekcji komórek białko z metką GFP kierowane jest do jądra, czego efektem jest fluorescencyjna, zielona „kropka” w jądrze.

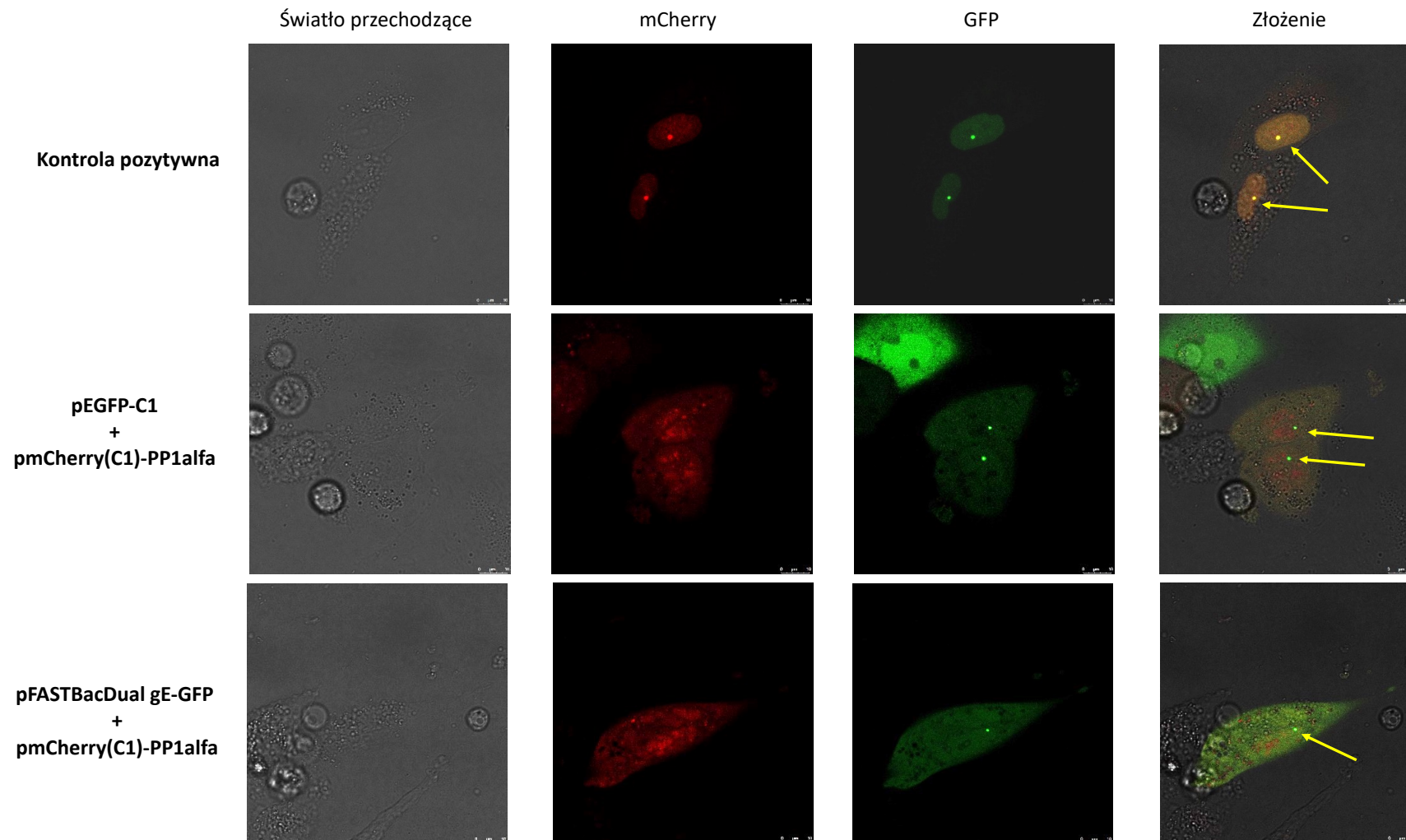
W wypadku interakcji między analizowanymi białkami, dojdzie do ich kolokalizacji w jądrze i pojawienia się na złożeniu obrazów „kropki” fluoryzującej na żółto.



**Ryc. 43: Schemat przeprowadzenia analizy interakcji gE-PP1α w systemie F2H.** Żółta kropka w jądrze jest rezultatem złożenia fluorescencyjnego sygnału z GFP oraz mCherry na skutek bezpośredniej interakcji gE-PP1α. Zielona kropka w jądrze jest efektem zakotwiczenia gE-GFP w jądrze i świadczy o braku bezpośredniej interakcji gE-PP1α.

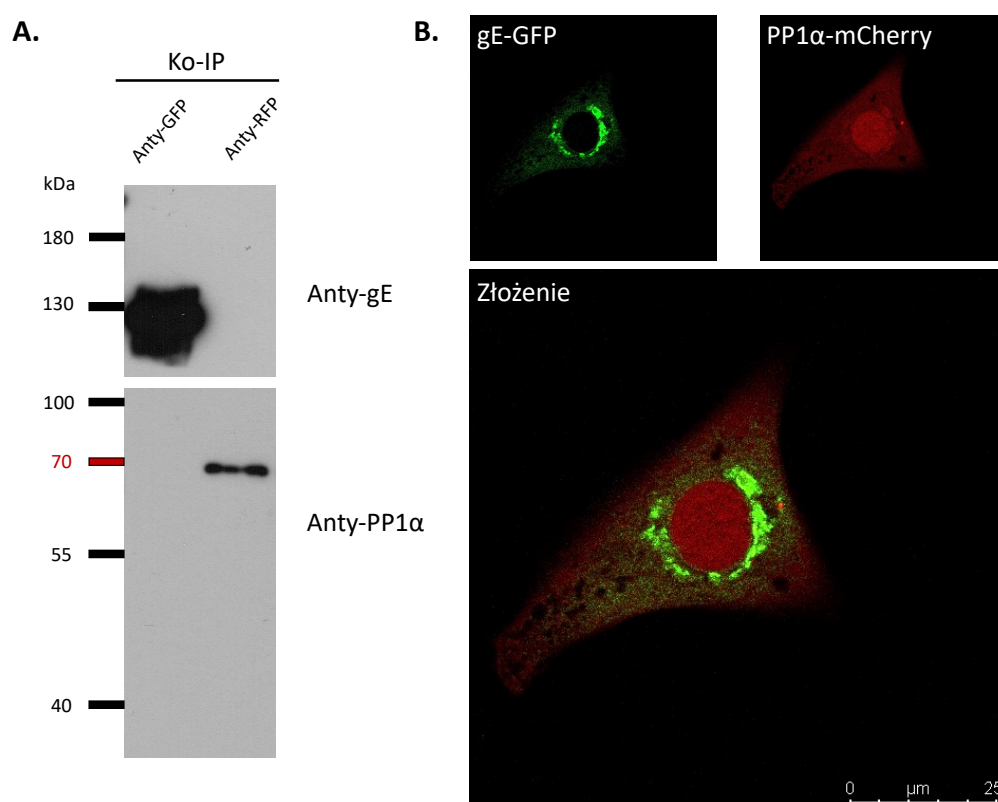
Do zbadania interakcji gE z PP1α wykorzystano wektor pFASTBacDual gE-GFP, kodujący gE-GFP pod kontrolą promotora HCMV (**Materiały 6.6.4**) oraz skonstruowano wektor pmCherry(C1)-PP1alfa, kodujący PP1α-mCherry także pod kontrolą tego samego promotora. Wektor pmCherry(C1)-PP1alfa powstał na matrycy DNA plazmidowego pEGFP(C1)-PP1alpha (**Materiały 6.6.3**) wykorzystując metodę NEBuilder® (**Metody 7.33**). Kotransfekcję wektorów plazmidowych do komórek F2H®-BHK przeprowadzono przy pomocy zestawu jetPRIME®, Polyplus (**Materiały 6.14.8**), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Jako kontrolę pozytywną zastosowano DNA kontrolny dostarczony przez producenta zestawu F2H. W kontroli negatywnej zamiast wektora pFASTBacDual gE-GFP do kotransfekcji użyto DNA plazmidowego pEGFP-C1 (**Materiały 6.6.5**),

kodującego białko GFP pod kontrolą promotora HCMV. Uzyskane wyniki (**Ryc. 44**) jednoznacznie wykazują brak kolokalizacji sygnału fluorescencyjnego gE-GFP z PP1 $\alpha$ -mCherry, co świadczy o braku bezpośredniej interakcji gE-PP1 $\alpha$ . Przyczyną tego może być oddziaływanie fosfatazy jedynie z białkiem gE pozostającym w kompleksie z gI i/lub konieczność obecności innych białek wirusowych w komórce, by doszło do tej interakcji.



**Ryc. 44: Brak bezpośredniej interakcji gE-GFP z PP1 $\alpha$ -mCherry w systemie F2H.** Brak kolokalizacji sygnału fluorescencyjnego z PP1 $\alpha$ -mCherry oraz gE-GFP świadczy o braku bezpośredniej interakcji tych białek w komórkach transfekowanych plazmidami pmCherry(C1)-PP1alfa oraz pFASTBacDual gE-GFP. Żółte strzałki wskazują na lokalizację fluorescencyjnej „kropki” w jądrze komórkowym na złożeniu obrazu, czyli miejsca wiązania GFP z platformą kotwiczącą.

Wynik uzyskany w systemie F2H potwierdzono dodatkowo w komórkach bydlęcych. Pierwotne fibroblasty bydlęce kotransfekowano plazmidami pFASTBacDual gE-GFP oraz pmCherry(C1)-PP1alfa. Następnie komórki lizowano, poddano koimmunoprecypitacji na kulkach magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami anty-GFP lub anty-RFP, rozdzielono w 15% żelu poliakrylamidowym i poddano immunodetekcji z wykorzystaniem przeciwciał anty-gE oraz anty-PP1 $\alpha$  (**Ryc. 44 A**). Białko gE-GFP nie koimmunoprecypitowało z PP1 $\alpha$ -mCherry. Wykonano również analizę mikroskopową lokalizacji wewnątrzkomórkowej gE-GFP oraz PP1 $\alpha$ -mCherry, w której także nie stwierdzono istotnie statystycznej kolokalizacji tych dwóch białek (**Ryc. 44 B**). Fosfataza zlokalizowana była głównie w jądrze komórkowym oraz cytoplazmie. Natomiast gE-GFP w okolicy okołojądrowej oraz w postaci drobnych punktów w cytoplazmie.



**Ryc. 45: Brak bezpośredniej interakcji gE-PP1 $\alpha$  w komórkach bydlęcych.** Bydlęce fibroblasty kotransfekowano plazmidami pmCherry(C1)-PP1alfa oraz pFASTBacDual gE-GFP. (A.) Immunoprecypitacja na kulkach magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami anty-GFP lub anty-RFP. Immunodetekcja z wykorzystaniem przeciwciał mysich monoklonalnych anty-gE, przeciwciał króliczych anty-PP1 $\alpha$  oraz przeciwciał drugorzędowych anty-mysich lub anty-króliczych koniugowanych z HRP. MW PP1 $\alpha$ -mCherry - ok. 64 kDa. (B.) Analiza mikroskopowa kolokalizacji gE-GFP oraz PP1 $\alpha$ -mCherry. Zdjęcia wykonane przy użyciu obiektywu 63x.

## Podsumowanie wyników:

- Różnice w wielkości łysinek wirusowych w środowisku przeciwciał neutralizujących wirusa oraz pod 1% roztworem metylocelulozy w medium mogą wskazywać na preferowaną drogę transmisji BHV-1 w zależności od typu komórek.
- Wyniki testu na prędkość CTC pokazały dynamikę tego procesu w każdej godzinie obserwacji, wykazując różnice w tempie transmisji między rekombinantem BHV-1 gE-GFP a BHV-1 gE-GFP  $\Delta$ US3, na korzyść tego pierwszego w 9 hpi. Ponadto analiza tempa CTC wskazała na szybsze rozprzestrzenianie się rekombinantów BHV-1 gE-GFP i BHV-1 gE-GFP  $\Delta$ US3 w bydlęcych fibroblastach niż w komórkach MDBK.
- Stosując analizę przyżyciową, zaobserwowano wyraźne opóźnienie lokalizacji gE-GFP w połączeniach międzykomórkowych przy delecji US3 w 12 godzinie od infekcji. Po 24 hpi różnica w czasie translokacji została zniwelowana. Wyniki dodatkowo potwierdzono w cytometrii przepływowej oraz w obrazowaniu 3D preparatów barwionych immunofluorescencyjnie.
- W analizie transmisji rekombinanta BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry w środowisku przeciwciał neutralizujących wykazano transfer białek fuzyjnych za pośrednictwem międzykomórkowych nanorurek.
- Zidentyfikowano 17 białek potencjalnego interaktomu kompleksu gE/gI, z czego sześć lokalizowało się w błonie komórkowej. Najwyższą wartość stosunku wzbogacania  $\log_2$  gE-GFP/KN oraz  $\log_2$  gE-GFP/gETM<sup>-</sup>-GFP zaobserwowano dla PP1 $\alpha$ . Dodatkowo interakcję gE-GFP z PP1 $\alpha$  potwierdzono poprzez koimmunoprecypitację oraz immunodetekcję metodą Western Blotting w trzech typach komórek bydlęcych.
- Wykazano kolokalizację wewnątrzkomórkową kompleksu gE/gI i PP1 $\alpha$  w obrębie błony komórkowej oraz międzykomórkowych nanorurek.
- Dowiedziono, że interakcja między gE-GFP a PP1 $\alpha$  zachodzi już w 8 hpi, czyli od początku produkcji glikoproteiny w infekowanych komórkach.
- W systemie dwuhybrydowym F2H oraz w kotransfekcji komórek bydlęcych plazmidami niosącymi geny kodujące gE-GFP oraz PP1 $\alpha$ -mCherry dowiedziono, że nie zachodzi bezpośrednia interakcja między gE a PP1 $\alpha$ . Wskazuje to na konieczność obecności kompleksu gE/gI i/lub innych białek wirusowych do zajścia tego oddziaływania.



## 9. Dyskusja

Celem niniejszej pracy doktorskiej było dokładniejsze poznanie roli białkowego kompleksu glikoprotein gE/gI oraz kinazy US3 w bezpośrednim transporcie międzykomórkowym (CTC) wirusa BHV-1 oraz identyfikacja potencjalnych partnerów komórkowych gE/gI w tym procesie. Tematyka pracy była kontynuacją wieloletnich badań nad tą drogą transmisji alfa herpeswirusów prowadzonych w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów MWB. W toku wcześniejszych eksperymentów prowadzonych w Zakładzie wykazano m. in. kluczową rolę domeny przezbłonowej glikoproteiny gE w transmisji na drodze CTC [225] oraz wpływ aktywności US3 na tworzenie wypustek aktywnych [197] i międzykomórkowych nanorurek [172].

W pierwszym etapie pracy eksperymentalnej opracowałam test na określenie prędkości CTC w żywych komórkach różnego typu. Test polegał na zliczaniu pojedynczych komórek infekowanych przez fluorescencyjnie znakowane rekombinanty BHV-1 w ciągu każdej godziny obserwacji przeprowadzonych z zastosowaniem mikroskopowej analizy przyżyciowej. Potrzeba opracowania takiego testu wynikała z dużych rozbieżności w wynikach klasycznego testu wielkości łysek. Rozbieżności te wynikają ze znacznego odchylenia standardowego w średniej wielkości łysek wirusowych oraz z różnic w czasie powstawania łysek, związanych z dynamiką procesu CTC. W literaturze naukowej brak również ujednoliconej jednostki do porównania wielkości łysek. Część autorów porównuje pole powierzchni łysek [170], [240], [459]–[461], inni natomiast średnicę łysek wirusowych [462]–[465], co może wpływać na wiarygodność wyników, zwłaszcza jeśli łyseki mają nieregularny kształt.

Do tej analizy wybrałam transformowane nowotworowo komórki linii MDBK, które są rutynowo stosowane w badaniach nad infekcją BHV-1 oraz pierwotne fibroblasty bydłęce. Wpływ kompleksu gE/gI oraz kinazy białkowej US3 na tempo procesu CTC został zbadany przy użyciu wcześniej skonstruowanych w ZBMW rekombinantów BHV-1 gE-GFP oraz BHV-1 gETM<sup>-</sup>GFP, jak również skonstruowanego przeze mnie (w trakcie wykonywania pracy magisterskiej) mutantu BHV-1 gE-GFP $\Delta$ US3. Eksperymenty przeprowadzałam w obecności przeciwciał neutralizujących wirusa BHV-1 po uprzedniej optymalizacji ich właściwej ilości w teście neutralizacji wirusa zewnątrzkomórkowego, w zależności od typu infekowanych komórek. W przypadku komórek MDBK było to 40  $\mu$ l

surowicy neutralizującej na 1 ml medium oraz 160  $\mu$ l/ml dla fibroblastów bydlęcych. Fakt, że do neutralizacji zewnątrzkomórkowego BHV-1 podczas infekcji fibroblastów potrzebna była aż cztery razy większa ilość surowicy niż w przypadku komórek MDBK, może być związany z wydajniejszym uwalnianiem wirusa do pożywki w tych komórkach. Namnażając wirusa w fibroblastach bydlęcych, zawsze uzyskiwane było wyższe miano BHV-1 niż w komórkach MDBK, niezależnie od zastosowanego rekombinanta (dane niepokazane). Wyniki testu wielkości łysek potwierdziły ważną rolę glikoproteiny gE w procesie CTC. Delecja domeny przebłonowej oraz cytoplazmatycznej skutkowała znaczną redukcją rozmiaru łysek wirusowych w obu typach komórek. W przypadku mutantów BHV-1  $\Delta$ US3 oraz BHV-1 gE-GFP $\Delta$ US3 nie stwierdziłam istotnej statystycznie różnicy w rozmiarze łysek w porównaniu do BHV-1 WT w obu typach komórek. Jest to wynik sprzeczny z danymi opublikowanymi przez Zhao i wsp. w 2017 roku [462], wg których łyseki formowane przez mutanty BHV-1  $\Delta$ US3 w komórkach MDBK były o ok. 30% mniejsze w porównaniu do typu dzikiego wirusa. Najczęstszym wytłumaczeniem dla rozbieżności w wynikach podobnych badań są różnice międzyszczepowe. W przypadku Zhao i wsp. był to amerykański szczep Cooper, natomiast w tej pracy używałam holenderskiego szczepu Lam. Oba szczepy należą do podtypu BHV-1.1. Na brak różnic w fenotypie łysek między BHV-1  $\Delta$ US3 a typem dzikim wirusa wskazywali również Takashima i wsp. [365], jednak w publikacji nie zawarto analizy statystycznej dotyczącej porównania wielkości łysek. Moje wstępne obserwacje dotyczące braku wpływu US3 na rozmiar łysek wirusowych BHV-1 w komórkach MDBK oraz KOP-R zostały opublikowane w artykule naukowym Brzozowska i wsp., 2018 [362].

Dodatkowo zdecydowałam się również porównać sposoby ograniczenia rozprzestrzeniania się wirusa na drodze CFE. Jak już wspominałam we wstępie do tej pracy oraz w wynikach, tę drogę infekcji można ograniczyć stosując przeciwciała neutralizujące [155], [170], [172], [181], [374], [375] lub media hodowlane zawierające metylocelulozę lub agarozę, które stanowią barierę mechaniczną dla wirusa zewnątrzkomórkowego [155], [362], [365], [375], [465]. W literaturze naukowej oba sposoby są stosowane zamiennie w badaniach nad transmisją wirusów na drodze CTC. W publikacjach natrafiłam na porównania wielkości łysek formowanych w mediach półpłynnych, tj. z dodatkiem metylocelulozy czy mikrokrystalicznej celulozy Avicel<sup>TM</sup> do agarozy, lecz nie spotkałam się z porównaniem wspomnianych mediów do tych zawierających przeciwciała neutralizujące

[466]–[468]. Bez wątplenia ciekawym wynikiem była aż 50% redukcja rozmiaru łyseinek formowanych przez wirusa BHV-1 WT oraz jego rekombinanty w środowisku przeciwciał neutralizujących w komórkach MDBK w porównaniu do tych w 1% roztworze metylocelulozy. Podobnej różnicy nie zaobserwowałam w hodowli pierwotnych fibroblastów bydlęcych. W przypadku tych komórek jedynie rekombinanty silnie upośledzone pod względem CTC formowały mniejsze o 20% łyseinki w medium z dodatkiem surowicy neutralizującej względem tych pod metylocelulozą. W **podrozdziale 8.1.1.2** wspominałam, że takie wyniki mogą wskazywać na preferowaną drogę infekcji BHV-1 w zależności od typu komórek. Prawdopodobnie pojedyncza łyseinka wirusowa w komórkach MDBK może być rezultatem zarówno transmisji na drodze CTC, jak i CFE. W związku z tym, konieczny jest właściwy dobór mediów ograniczających infekcję ze środowiska zewnątrzkomórkowego w zależności od typu komórek. Wracając do badań Zhao i wsp. [462] być może właśnie z nieprawidłowego doboru medium ograniczającego CFE mogą wynikać rozbieżności w wielkości łyseinek pomiędzy rekombinantami BHV-1  $\Delta$ US3 w porównaniu do typu dzikiego wirusa. Autorzy nie podali żadnej informacji dotyczącej sposobu ograniczenia rozprzestrzeniania wirusa na drodze CFE. Zastosowanie bariery mechanicznej mogło więc nie ograniczyć w wystarczający sposób rozprzestrzeniania się wirusa BHV-1 WT na drodze CFE i równocześnie rzutować na wielkość formowanych przez niego łyseinek. Innym wytłumaczeniem redukcji rozmiaru łyseinek wirusowych w środowisku przeciwciał neutralizujących w komórkach MDBK może być hamowanie samej drogi CTC. Wpływ przeciwciał neutralizujących na CTC herpeswirusów jest wciąż tematem spornym wśród badaczy. Eksperymenty skoncentrowane są głównie na oszacowaniu wpływu przeciwciał skierowanych przeciwko konkretnym glikoproteinom osłonkowym na hamowanie tego procesu a nie właściwościom poliklonalnej surowicy neutralizującej. Szczególnym przykładem sprzecznych wyników odnośnie hamowania CTC przez przeciwciała neutralizujące są badania nad wirusem HCMV, którego transmisja zachodzi w większości na tej drodze infekcji, przy relatywnie niskim mianie wirusa zewnątrzkomórkowego [144], [469], [470]. Według Reuter i wsp. [471] przeciwciała skierowane przeciwko glikoproteinom gB oraz gH istotnie ograniczały CTC ludzkiego cytomegalowirusa zarówno w komórkach nabłonkowych, jak i w fibroblastach. Wynik ten przeczy wcześniejszym badaniom Jacob i wsp., gdzie nie wykryto działania hamującego CTC przeciwciał specyficznych wobec tych

dwóch glikoprotein [472]. Badania nad hamowaniem transmisji CTC przez przeciwciała swoiste wobec glikoprotein osłonkowych przeprowadzono m. in. także dla wirusów HSV-1 oraz HSV-2. Awasthi i wsp. wykazali, iż przeciwciała anty-gD oraz gE hamują CTC wirusa HSV-2 [459]. Natomiast Krawczyk i wsp. dowiedli, że rekombinowane przeciwciała anty-gB hamowały bezpośredni transport międzykomórkowy wirusa HSV-1 [473]. Aby absolutnie wykluczyć hamowanie CTC wirusa BHV-1 w komórkach MDBK przez surowicę neutralizującą, należałoby zbadać jej dokładny skład.

Podobnie jak w teście wielkości łysek wirusowych, wyniki testu prędkości CTC wykazały, iż nie ma istotnej statystycznie różnicy w tempie rozprzestrzeniania się rekombinantów gE-GFP oraz gE-GFP $\Delta$ US3 w obu testowanych liniach komórkowych. Natomiast w przypadku rekombinanta gETM<sup>-</sup>-GFP wyniki analizy przyżyciowej różniły się w porównaniu do tych uzyskanych w teście wielkości łysek. Stwierdziłam zmniejszoną o 50% prędkość transmisji w porównaniu do BHV-1 gE-GFP, podczas gdy rozmiar łysek generowanych przez tego rekombinanta był zmniejszony o ok. 61% w komórkach MDBK i o 75% w fibroblastach. Poza inną dystrybucją komórek w hodowli, różnicami w ich migracji lub ewentualnymi podziałami komórek w trakcie infekcji, ta rozbieżność wyników może być tłumaczona także ograniczeniem precyzji oprogramowania stosowanego do określenia wielkości łysek. Standardowo pomiar wielkości łysek wirusowych przeprowadzany jest przynajmniej po 48 hpi, czyli gdy są one na tyle duże, aby można było określić ich pole lub średnicę. łyseki formowane przez rekombinanty silnie upośledzone pod względem replikacji lub CTC są znacznie mniejsze od łysek wirusa WT i właściwe oszacowanie ich wielkości przez oprogramowanie może być nieprawidłowe. Innymi słowy, dokładniejsze oszacowanie rozmiaru łysek jest łatwiejsze, gdy łyseki są większe. Test prędkości CTC pozwolił na precyzyjne oznaczenie ilości infekowanych komórek niezależnie od morfologii łysek danego rekombinanta.

Ważną zaletą testu prędkości CTC był wgląd w dynamikę transmisji wirusa w każdej godzinie obserwacji. Dzięki temu możliwe było bardzo dokładne zbadanie efektów mutacji kinazy US3 na transmisję wirusa BHV-1. W 9 hpi, w hodowli komórek MDBK zaobserwowałam istotną statystycznie różnicę w prędkości CTC pomiędzy rekombinantami BHV-1 gE-GFP oraz gE-GFP $\Delta$ US3 na korzyść tego pierwszego, która następnie została zniwelowana w 12 hpi. Kolejną ważną informacją odnośnie do roli kinazy US3 w CTC było opóźnienie lokalizacji gE-GFP w połączeniach komórkowych

w infekcji mutantem BHV-1 gE-GFP $\Delta$ US3 w obu testowanych typach komórek. Także w tym wypadku różnica była najlepiej widoczna do 12 hpi, po czym została zniwelowana w kolejnych godzinach obserwacji. Obserwacje mikroskopowe potwierdziłam w cytometrii przepływowej oraz przy pomocy obrazowania 3D lokalizacji kompleksu gE/gI w połączeniach komórkowych. Wykazałam, iż na powierzchni komórek infekowanych rekombinantem kodującym nieaktywną formę kinazy – BHV-1 US3KD znajdowało się o ok. 30% mniej kompleksu gE/gI w porównaniu do infekcji wirusem WT. Barwienie immunofluorescencyjne także wykazało, iż kompleks glikoprotein znajdował się w połączeniach komórkowych tylko przy zachowaniu aktywności kinazy US3. Zanik różnic w tempie transmisji CTC oraz w lokalizacji kompleksu gE/gI po 12 hpi może wskazywać na mechanizm kompensacyjny tej mutacji w trakcie infekcji wirusowej. W badaniach Gershburg i wsp. [474], wykazano, że delecja kinazy US3 miała niewielki wpływ na poziom uwalniania wirionów HSV-1 z komórek oraz na transmisję wirusa, co może być związane kompensacją jej defektu przez inną kinazę wirusową – UL13. Dowodem na powyższą hipotezę było znaczne upośledzenie podwójnego mutantu HSV-1  $\Delta$ UL13/ $\Delta$ US3 pod względem wielkości łysek oraz uwolnienia wirionów potomnych z infekowanych komórek. Innym wytłumaczeniem może być zaobserwowany przeze mnie w czasie wykonywania pracy magisterskiej wyższy poziom białka gE w mutantach delecyjnych US3 w porównaniu do BHV-1 WT, który mógł „usprawnić” CTC na późniejszych etapach infekcji.

W standardowym teście wielkości łysek wirusowych uzyskane dane zawsze przedstawiane są jako procent wielkości łysek formowanych przez typ dziki wirusa. Ze względu na inną morfologię niemożliwe jest porównanie wielkości łysek danego rekombinanta w różnych typach komórek. Dzięki testowi na prędkość CTC możliwe było zbadanie różnic w tempie transmisji fluorescencyjnych rekombinantów BHV-1 w komórkach MDBK oraz pierwotnych bydlęcych fibroblastach. Wyniki tej analizy pokazały, iż rekombinanty BHV-1 gE-GFP jak i BHV-1 gE-GFP  $\Delta$ US3 rozprzestrzeniały się szybciej w fibroblastach niż w komórkach nabłonkowych. Transmisja za pośrednictwem CTC alfa herpeswirusów w komórkach nabłonkowych oraz w fibroblastach jest preferowaną drogą infekcji oraz jedyną w komórkach nerwowych. Potrzebne są jednak dodatkowe badania, aby rozstrzygnąć, jakie czynniki komórkowe mogłyby wpłynąć na jej tempo w różnych rodzajach komórek.

Opracowana przeze mnie oryginalna metodologia testu prędkości CTC nie została do tej pory opisana w literaturze naukowej. Próby innego opisanie tej drogi infekcji herpeswirusów niż przez klasyczny test wielkości łysek zostały podjęte przez Dingwell i wsp. [155], Arias-Arias i wsp. [475] oraz Reuter i wsp. [471]. Dingwell i wsp. analizowali transmisję wirusa HSV-1 na drodze CTC poprzez zliczanie wybarwionych immunochemicznie komórek wchodzących w skład łyseki wirusowej, 48 hpi [155]. Jednak w tym eksperymencie, analiza statystyczna średniej ilości komórek wchodzących w skład pojedynczej łyseki wirusowej obarczona była dużym odchyleniem standardowym – w przypadku wirusa WT było to nawet +/- 20% komórek. W badaniach Reuter i wsp. analizowano przyrost łysek fluorescencyjnych rekombinantów wirusa CMV w czasie od 4 do maksymalnie 18 dnia od infekcji przy użyciu aparatury dedykowanej do techniki ELISPOT – CTL Immunospot®S6 Ultimate UV Analyzer (Cellular Technology Limited, Niemcy). Następnie przy pomocy dołączonego do sprzętu oprogramowania określano średnią wielkość łysek wirusowych na 1 dołek płytki 96-dołkowej. Celem testu było określenie wpływu przeciwciał skierowanych przeciwko glikoproteinom osłonkowym na CTC. W tym przypadku wyniki także były obarczone dość dużym odchyleniem standardowym, zwłaszcza w przypadku łysek formowanych w pożywce bez dodatku przeciwciał, co mogło rzutować na istotnie statystyczną różnicę między porównanymi rodzajami przeciwciał. Test autorstwa Arias-Arias i wsp. był najbardziej podobny do metody opracowanej przeze mnie. Jako jedyny z przytoczonych badań bazował na analizie wzrostu pojedynczych łysek wirusowych w czasie rzeczywistym. Autorzy publikacji wykorzystali barwniki fluorescencyjne wiążące DNA o różnym stopniu przenikalności przez błonę komórkową, by zwizualizować efekt cytopatyczny zachodzący w komórkach formujących łyseki wirusowe. Opracowany przez nich algorytm analizy zebranych w mikroskopie obrazów pozwolił na zliczenie pojedynczych komórek wchodzących w skład łysek wirusowych. Autorzy wskazują na wygodę i szybkość opracowanego przez nich protokołu oraz brak konieczności stosowania do analizy fluorescencyjnych rekombinantów wirusowych. Jednak analiza wzrostu łysek w czasie przy pomocy tego oprogramowania pozwoliła na śledzenie wzrostu łysek dopiero w 24 hpi, co przekładało się na infekcję min. 164 komórek. Na wcześniej zebranych obrazach algorytm nie wykrył infekcji wirusowej, co z kolei nie pozwala śledzić jej wczesnych etapów. Zastosowanie niefluorescencyjnych wirusów/rekombinantów może także przyczynić się do

zafałszowania ilości infekowanych komórek w danym punkcie czasowym, ponieważ obserwowany jest jedynie efekt cytopatyczny, czyli końcowy etap infekcji. Dodatkowo analiza także w tym przypadku była obciążona dużym odchyleniem standardowym. Ilość komórek wchodzących w skład jednej łysinki wirusowej w 72 hpi wahała się od ok. 3000 do 8000. W mojej opinii test opracowany przez Arias-Arias i wsp. jest ulepszoną wersją klasycznego testu analizy wielkości łysinek wirusowych, lecz podobnie jak ten test nie daje wglądu w dynamikę procesu CTC na wczesnych etapach infekcji.

Przyczyną wysokiej wartości odchylenia standardowego we wszystkich trzech przytoczonych badaniach był najprawdopodobniej brak synchronizacji momentu rozpoczęcia infekcji komórek. Nie stanowi to problemu w przypadku opracowanego w niniejszej pracy testu prędkości CTC, ze względu na wybór do dalszej analizy pojedynczych komórek w początkowej fazie infekcji, monitorowanej przez produkcję fluorescencyjnych białek fuzyjnych. Ograniczeniem uniwersalnego zastosowania wszystkich trzech testów jest również sama morfologia łysinek. W eksperymencie przeprowadzonym przez Dingwell i wsp. użyto ludzkich fibroblastów pierwotnych, które silnie przylegały do podłoża, tak więc w centrum łysinki nie powstały charakterystyczne puste przestrzenie, obserwowane w łysinkach formowanych w innych, często wykorzystywanych do badań, liniach komórkowych. W związku z tym, przeprowadzając podobny eksperyment w hodowli komórek Vero [476], Huh7 [477] czy HeLa [478] niemożliwe byłoby zliczenie całkowitej liczby komórek wchodzącej w skład łysinki wirusowej. Analiza przyżyciowa w teście prędkości CTC pozwoliła na śledzenie ruchu komórek, monitorowanie ich podziałów w czasie trwania eksperymentu (co jest szczególnie ważne w przypadku komórek transformowanych nowotworowo) oraz dysocjacji od podłoża w końcowym etapie infekcji. W związku z tym pusta przestrzeń w centrum łysinki nie stanowiły przeszkody w analizie ilości komórek infekowanych w czasie, a otrzymane wyniki były wiarygodne i powtarzalne.

Test na prędkość CTC może być używany uniwersalnie do badania tej drogi infekcji także u innych wirusów. Jednak jego ograniczeniami są pole widzenia w mikroskopie oraz konstrukcja rekombinantów niosących geny kodujące odpowiednie białka wirusowe w fuzji z metkami fluorescencyjnymi. Pole widzenia mikroskopu w zależności od wielkości komórek użytych do testu może ograniczyć czas obserwacji do kilku godzin lub nawet wykluczyć dany typ komórek z analizy. W przypadku mojej pracy eksperymentalnej,

musiałam wykluczyć komórki KOP-R, ponieważ wielkość pojedynczej komórki przekraczała pole widzenia w mikroskopie przy użyciu obiektywu 63x. Zastosowanie obiektywu o mniejszym powiększeniu również nie było możliwe ze względu na szybkie fotowysbielanie białka gE-GFP oraz gETM-GFP. Konstrukcja fluorescencyjnych mutantów wirusowych nie zawsze jest możliwa, poza tym łączy się z czasochłonną izolacją i charakterystyką nowo otrzymanych rekombinantów. Sama metka fluorescencyjna może wpływać na prawidłową replikację oraz transmisję wirusa w komórkach, co może przełożyć się na wiarygodność otrzymanych wyników.

W przyszłości planuję wykorzystać test prędkości CTC do porównania tempa transmisji różnych alfaherspeswirusów w tym samym typie komórek, np. rekombinantów HSV-1 i BHV-1 z tą samą fuzją genową w pierwotnych fibroblastach ludzkich i bydłych. Kolejnym interesującym zastosowaniem testu jest także porównanie tempa transmisji CTC w kokulturach komórek nabłonkowych i fibroblastów lub komórek nerwowych.

W drugiej części tej pracy skonstruowałam rekombinanty wirusowe niosące fuzję małego białka kapsydowego VP26 z fluoroforem mCherry – BHV-1 VP26-mCherry oraz podwójnie fluorescencyjnego BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry. Jak już wspomniałam w **podrozdziale 4.1.1**, konstrukcja rekombinanta z fuzją VP26 z białkiem zielonej fluorescencji była jedną z pierwszych prób wyznakowania elementów strukturalnych alfaherpeswirusów [435]. Rekombinanty VP26 w fuzji z fluoroforem na N-końcu białka zostały skonstruowane m. in. dla wirusów PRV [237], HSV-1 [383], [438] oraz BHV-1 [384]. Przykładowo, rekombinant PRV GFP-VP26 został użyty do śledzenia transportu kapsydów w aksonach komórek nerwowych [237], a BHV-1 VP26-GFP posłużył do badania mechanizmu opuszczania jądra komórkowego przez kapsydy wirusowe [384].

Oba skonstruowane przeze mnie rekombinanty powstały na drodze homologicznej rekombinacji pełnej długości DNA wirusowego oraz DNA kasety do kotransfekcji. Następnie scharakteryzowałam je poprzez wykonanie krzywej wzrostu, testu wielkości łysek wirusowych oraz mikroskopowej analizy przyżyciowej. Dla mutantu z fuzją VP26-mCherry zaobserwowałam zarówno spadek miana wirusów uwalnianych do pożywki, jak i znacznie zmniejszony rozmiar łysek wirusowych w porównaniu do wirusa BHV-1 WT szczepu Lam. Uzyskane wyniki porównałam również do rekombinanta BHV-1 VP26-GFP, skonstruowanego przez Wild i wsp. na matrycy szczepu BHV-1 Jura WT [384]. Zarówno rekombinant BHV-1 VP26-mCherry, jak i BHV-1 VP26-GFP formowały łyseki zmniejszone



w tym samym stopniu w stosunku do macierzystego szczepu wirusa WT oraz wykazywały ok. 10-krotny spadek miana. Silne upośledzenie rekombinantów niosących fuzję białek fluorescencyjnych z VP26 jest typowe i zostało opisane także dla wirusów HSV-1 [438] oraz PRV [479]. Hogue i wsp. [381] wskazali jako przyczynę tego zjawiska brak mutacji kompensacyjnych, dimeryzację fluoroforów oraz związaną z nią agregację białka kapsydowego w jądrze komórkowym. Mutacje kompensacyjne zostały po raz pierwszy opisane dla rekombinanta HSV-1 EGFP-VP26 [170], [240], [459]–[461], który posiadał „spontaniczną” delecję 65 pz zawierającą 7 aa na N-końcu białka kapsydowego. „Przypadkowy” rekombinant nie przejawiał silnej atenuacji względem wirusa typu dzikiego. Nagel i wsp. dowiedli, iż usunięty fragment zawierał „enhancery” transkrypcji, co przekładało się na obniżenie produkcji białka fuzyjnego w komórkach [438], a co za tym idzie mniejszy stopień agregacji białka kapsydowego w jądrze. Podobną zależność zaobserwowano dla rekombinanta PRV EGFP-VP26 oraz PRV mCherry-VP26 [381]. Oba rekombinanty powstały na drodze rekombinacji DNA zawierającego gen kodujący białko fuzyjne oraz pełnej długości DNA wirusowego klonowanego do sztucznego chromosomu bakteryjnego (z ang. *bacterial artificial chromosome*, BAC) w bakteriiach *E. coli*. Po wprowadzeniu rekombinowanego DNA PRV EGFP-VP26 oraz PRV mCherry-VP26 do komórek ssaczy, zaobserwowano zarówno łyśinki o zmniejszonych, jak i normalnych rozmiarach w porównaniu do wirusa typu dzikiego. Po oczyszczeniu nukleokapsydów z „małych” łyśinek, w kolejnych pasażach wirusa pojawiły się znów łyśinki zmniejszonych i normalnych rozmiarów. Natomiast po izolacji nukleokapsydów z łyśinek normalnych rozmiarów, rekombinanty formowały tylko łyśinki nieodbiegające rozmiarem od łyśinek tworzonych przez wirusa WT. Niejednorodny fenotyp łyśinek wirusowych generowanych przez rekombinanty PRV EGFP-VP26 lub mCherry-VP26 tłumaczony był pojawieniem się mutacji kompensacyjnej, która miała zniwelować defekt spowodowany wprowadzeniem fuzji VP26 z białkiem fluorescencyjnym. Hogue i wsp. nie odkryli konkretnej mutacji kompensacyjnej w genomie wariantu PRV formującego łyśinki normalnego rozmiaru. Jednak autorzy spekulują, iż mutacja może znajdować się w sekwencji powtórzeniowej o zmiennej długości, zlokalizowanej pomiędzy ORF *u135* (gen kodujący VP26) oraz *u136* w genomie PRV. Ilość powtórzeń wg badaczy mogłaby wpływać na częstość rekombinacji w tym miejscu genomu oraz modulować produkcję VP26 w fuzji z białkiem fluorescencyjnym.

Kierując się badaniami Nagel i wsp. [438] oraz Hogue i wsp. [381], próbowałam wprowadzić podobną mutację w genomie rekombinanta BHV-1 VP26-mCherry. Podobnie jak w przypadku rekombinanta HSV-1 EGFP-VP26, skonstruowałam kolejne kasety do kotransfekcji niosące zmiennej długości delekcje sekwencji poprzedzającej ramkę odczytu ul35 (dane niepokazane). Niestety uzyskane przeze mnie rekombinanty utraciły czerwoną fluorescencję jeszcze na etapie izolacji. Przyczyną tego mogła być rekombinacja DNA, prowadząca do utraty białka fuzyjnego lub samej metki fluorescencyjnej. Innym powodem znacznego upośledzenia skonstruowanych przeze mnie rekombinantów mogła być sekwencja lewego rejonu flankującego gen fuzyjny w kasecie do kotransfekcji, który zawierał, wspomiane przez Hogue i wsp. [381], sekwencje powtórzeniowe pomiędzy ORF ul35 i ul36. Ze względu na nieprawidłową ilość powtórzeń w tej sekwencji po rekombinacji, mogło dojść do niepożądanego skrócenia lub wydłużenia tego rejonu w DNA rekombinantów, co mogło przełożyć się zarówno na stopień upośledzenia, jak i utratę fuzji genowej.

Kolejnym problemem w konstrukcji rekombinantów herpeswirusowych niosących fuzję VP26-fluorofor jest sam typ białka fluorescencyjnego. W badaniach Nagel i wsp. [438] przetestowano wpływ konkretnego fluoroforu (EGFP, YFP, CFP, mRFP) na późniejszą agregację kapsydów w jądrze komórkowym. W przypadku EGFP oraz YFP powstawało najwięcej agregatów, co wpływało na znaczne osłabienie replikacji oraz transmisji rekombinantów. Hogue i wsp. [381] wykazali, iż najlepszymi kandydatami do fuzji z białkiem kapsydowym w kontekście potencjalnej agregacji są białka następnej generacji, tj. mTurquoise2, mCherry oraz mNeonGreen. Ze względu na wyniki przytoczonych w tym paragrafie badań oraz tego, iż docelowo chciałam skonstruować podwójnie fluorescencyjnego rekombinanta, do fuzji genowej wybrałam właśnie mCherry. Pomimo tego, na późnym etapie infekcji BHV-1 VP26-mCherry i BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry w jądrze komórkowym zaobserwowałam duże agregaty zawierające białko fuzyjne. Agregaty białka kapsydowego powstają także w infekcji typem dzikim alfaherpeswirusów. Początkowo przypisywano im rolę miejsc składania dojrzałych kapsydów w jądrze komórkowych, tzw. *asemblonów* (z ang. *assemblons*) [480]. Wg m. in. Nagel i wsp. jest to efekt uboczny produkcji nadmiaru białek kapsydowych w komórce, które przy tak dużej ilości agregują [438], [481], [482]. Na potwierdzenie tej tezy Nagel i wsp. udowodnili, iż w obrębie agregatów poza białkiem VP26 znajdują się również inne nieznanowane

fluorescencyjnie białka wirusowe, tj. VP5, UL17 i UL25, lecz nie wykryli dojrzałych kapsydów. Biorąc pod uwagę tendencję białek fluorescencyjnych do tworzenia dimerów, pojawienie się dużej ilości agregatów przedwcześnie, może wymiarczkować pozostałe białka kapsydowe. Konsekwencją tego jest nieprawidłowa ilość wirionów potomnych w komórce, a co za tym idzie niższe miano rekombinantów niosących fuzję białek fluorescencyjnych z VP26 oraz ich wolniejsza transmisja, rzutująca na wielkość łysek wirusowych.

Pomimo znacznego upośledzenia rekombinatów VP26-fluorofor, taka fuzja pozostaje wciąż najlepszą opcją dla obserwacji kapsydów metodą mikroskopowej analizy przyżyciowej [483]. Przyczyną tego jest włączenie aż 900 kopii tego białka do każdego nowo powstającego kapsydu wirusowego, a co za tym idzie uzyskanie odpowiednio intensywnego sygnału fluorescencyjnego do obserwacji. Jako alternatywę do tej fuzji genowej, Bohannon i wsp. wskazują na nadające sztywność kapsydowi białko UL25 [387]. Fuzja UL25 z białkami fluorescencyjnymi nie wpływała na replikację wirusa oraz jego transmisję, jednak w związku z jedynie ok. 100 kopiami białka przypadającymi na jeden kapsyd, cząstki wirusowe nie wykazywały odpowiednio jasnej fluorescencji do wielu aplikacji, w tym analizy przyżyciowej [483]. W związku z tym, do śledzenia migracji elementów strukturalnych wirusa BHV-1 w połączeniach komórkowych wykorzystałam podwójnie znakowanego rekombinanta BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry. Eksperyment przeprowadziłam w komórkach KOP-R oraz pierwotnych bydlęcych fibroblastach w obecności przeciwciał neutralizujących w pożywce, których właściwą ilość określiłam w teście neutralizacji wirusa zewnątrzkomórkowego. W obu typach komórek zaobserwowałam transfer wyznakowanych fluorescencyjnie białek wirusowych w międzykomórkowych nanorurkach (TNT) pomiędzy komórką niezainfekowaną a zainfekowaną. Przy czym transport gE-GFP odbywał się raczej za pośrednictwem dużych pęcherzyków, natomiast białka kapsydowe były transportowane w większości jako oddzielna struktura. Oczywisty rozdział sygnału fluorescencyjnego gE-GFP i VP26-mCherry może wskazywać na podobieństwo transmisji za pośrednictwem TNT do transportu aksoplazmatycznego, w którym elementy strukturalne wirionów transferowane są oddzielne, a następnie dojrzałe wiriony składane są w komórce ulegającej infekcji [484]. Ponieważ Jansens i wsp. udowodnili, iż w pełni opłaszczony osłonką wirusy PRV są transportowane przez TNT [168], należy przeprowadzić dodatkowe badania

z zastosowaniem mikroskopii elektronowej, by potwierdzić powyższą hipotezę. Wyniki tych obserwacji zostały opublikowane w pracy naukowej Panasiuk i wsp. 2018 [172].

W ostatnim etapie mojej pracy doktorskiej podjęłam próbę identyfikacji czynników komórkowych oddziałujących z kompleksem glikoprotein gE/gI wirusa BHV-1 w transmisji na drodze CTC. Jak już wspomniałam w **podrozdziale 4.3.4.1**, hipotezę o istnieniu specyficznego receptora oddziałującego z kompleksem w obrębie połączeń międzykomórkowych jako pierwsi wysunęli Polcicova i wsp. w 2005 [335]. Przez kolejne kilkanaście lat nie zidentyfikowano żadnych interakcji gE/gI z białkami komórkowymi, które w oczywisty sposób mogły wpływać na wydajność procesu CTC. Jedynym wyjątkiem było wykazane przez Li i wsp. oddziaływanie glikoproteiny gE wirusa VZV z enzymem degradującym insulinę, jednak podobnej interakcji nie udowodniono dla żadnego innego alfa herpeswirusa [338]–[340]. Identyfikację potencjalnego interaktomu przeprowadziłam metodą spektrometrii masowej z zastosowaniem potrójnego SILAC ze zmianą piętna [485]. Do tej analizy także wybrałam rekombinanty fluorescencyjne BHV-1 gE-GFP oraz BHV-1 gETM-GFP. Metka GFP białka fuzyjnego pełniła w tym eksperymencie podwójną rolę – pozwoliła na monitorowanie lokalizacji wewnątrzkomórkowej gE, tak by określić precyzyjnie czas translokacji kompleksu do połączeń komórkowych oraz posłużyła do późniejszej koimmunoprecypitacji białek potencjalnie z nim oddziaływujących. Poza standardową kontrolą komórek nieinfekowanych, zastosowałam również komórki infekowane rekombinantem BHV-1 gETM-GFP, ze względu na silne upośledzenie jego transmisji na drodze CTC, wynikające z braku lokalizacji kompleksu gE/gI w połączeniach komórkowych.

Pracę eksperymentalną rozpocząłam od właściwego doboru detergentu do lizy, co jak dowiedziałam się w trakcie szkolenia ze spektrometrii masowej na Uniwersytecie Ernst Moritz Arndt w Greiswaldzie, może okazać się kluczowe dla otrzymania wiarygodnych wyników. W tym kontekście, odpowiedni do tej analizy detergent nie powinien zakłócić integralności kompleksu oraz umożliwić koimmunoprecypitację wszystkich białek stanowiących potencjalny interaktom. Przetestowałam pięć detergentów, z czego Tween 20 oraz NP-40 odrzuciłam na etapie sprawdzania integralności kompleksu przy użyciu wysoko specyficznych przeciwciał anti-gE/gI (Mab75) w metodzie Dot Blot (dane niepokazane). Ostatecznie najlepsze wyniki otrzymałam w przypadku lizy komórek

buforem zawierającym 1% CHAPS i to właśnie ten detergent stosowałam do przygotowania próbek do analizy w spektrometrze masowym.

Analizę proteomiczną przeprowadziłam przy współpracy z Pathoproteomics Reserch Group (Uniwersytet Ernst Moritz Arndt, Greiswald, Niemcy). Na podstawie uzyskanych danych z trzech powtórzeń biologicznych eksperymentu, zidentyfikowano 17 białek komórkowych będących potencjalnymi partnerami kompleksu gE/gI. Sześć z nich posiadało lokalizację błonową: podjednostka katalityczna  $\alpha$  białkowej fosfatazy 1 (PP1 $\alpha$ ), talina 1, pompa wapniowa 2 (SERCA2), podjednostka  $\alpha$ -1 ATPazy Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, białko szoku termicznego  $\beta$ -1 oraz plektyna. Z białek potencjalnego interaktomu plektyna oraz karioferyna  $\beta$ -1 koimmunoprecypitowały także z gE-GFP wirusa PRV [243].

Równoległe badania o podobnej tematyce podjęli Watanabe i wsp. [341] oraz Md Firoz Ahmed [486], którzy próbowali zidentyfikować interaktom glikoproteiny gE wirusa HSV-1 metodą spektrometrii masowej. Watanabe i wsp. zidentyfikowali ponad 700 białek potencjalnie oddziaływujących z gE. Ponieważ nie ujawniono całości wyników spektrometrii masowej, niemożliwe było porównanie ich do tych uzyskanych w tej pracy. Autorzy skupili się na analizie oddziaływania glikoproteiny gE z prohibityną-1 (PHB-1). W kolejnych eksperymentach potwierdzili oni interakcję części C-końcowej PHB-1 z gE oraz znaczne zmniejszenie wielkości łysek wirusowych przy zahamowaniu produkcji tego białka. Ostatecznie Watanabe i wsp. stwierdzili, iż oddziaływanie gE-PHB-1 jest potrzebne do wydajnego transportu wirionów z cytoplazmy infekowanych komórek do połączeń komórkowych poprzez aktywację ścieżki sygnałowej kinaz MAPK/ERK, z czego to ostatnie jest raczej spekulacją autorów na temat mechanizmu interakcji. Co ciekawe, zastosowanie inhibitorów PHB-1 lub kinazy MEK, uczestniczącej w szlaku aktywacji MAPK/ERK, skutkowało zmniejszeniem rozmiaru łysek wirusowych wirusów HSV-2, PRV, mysiego cytomegalowirusa (MCMV) oraz mysiego gammaherpeswirusa-68 (MHV-68), co wg autorów sugerowało konserwowaną ewolucyjnie funkcję PHB-1 w infekcji herpeswirusowej. Jednak nie wspomnieli oni o porównaniu uzyskanych wyników do komórek nieinfekowanych lub zainfekowanych rekombinantem  $\Delta$ gE (które mogłyby wykluczyć ewentualne artefakty spośród aż 700 białek potencjalnego interaktomu), analizie lokalizacji wewnątrzkomórkowej PHB-1 w trakcie infekcji oraz kolokalizacji tego białka z gE.

Z kolei Md Firoz Ahmed w swojej pracy doktorskiej zidentyfikował 20 białek potencjalnego interaktomu kompleksu gE/gI. Autor, podobnie jak w mojej pracy, zastosował potrójny SILAC ze zmianą piętna w komórkach linii HaCaT infekowanych HSV-1 WT lub  $\Delta$ gE (16 hpi) oraz komórkach nieinfekowanych. Wśród potencjalnych partnerów komórkowych w przeważającej większości znalazły się białka mitochondrialne oraz białka zaangażowane w proces oddychania wewnątrzkomórkowego. Jednak żadne z tych białek nie zostało zidentyfikowane przeze mnie w potencjalnym interaktomie gE BHV-1. Następnie autor potwierdził oddziaływanie gE w eksperymencie typu „pull down” z dwoma białkami mitochondrialnymi - Nipsnap-1, Nipsnap-2 oraz mioferliną (MYOF), zlokalizowaną w jądrze, błonie jądrowej oraz błonie komórkowej. Wykluczył on również interakcję z siedmioma innymi białkami potencjalnego interaktomu, w tym także z prohibityną. Kolejne eksperymenty autora skoncentrowane były na analizie wpływu białek Nipsnap oraz MYOF na cykl życiowy wirusa. Między innymi udowodnił on, że białka Nipsnap oddziaływały bezpośrednio z domeną cytoplazmatyczną gE, jednak nie zmieniały one swojej lokalizacji wewnątrzkomórkowej w czasie infekcji i nie kolokalizowały z gE. Ponadto w infekcji linii komórkowych z mutacją typu „knock-out” jednego lub obu białek Nipsnap nie stwierdził zmniejszenia miana wirusa zewnątrzkomórkowego ani istotnych zmian w wielkości tysinek wirusowych względem nieedytowanych genomowo komórek HaCaT. Uzyskanie takich wyników autor tłumaczył inną funkcją oddziaływania gE-Nipsnap niż transmisja wirusa, kompensacją utraty tych białek przez inne białka komórkowe lub tym, że ta interakcja po prostu jest artefaktem. W przypadku białka MYOF, które odpowiedzialne jest m.in. za recykling endosomów, wykazano częściową kolokalizację z glikoproteiną gE, gB oraz gD w komórkach transfekowanych. Ze względu na brak dowodów jednoznacznie przemawiających za rolą oddziaływania gE-Nipsnap w procesie transmisji wirusa HSV-1, autor uznał za bardziej logiczne podjęcie dalszych studiów nad innymi białkami interaktomu gE, w tym także nad mioferliną.

Wykluczenie oddziaływania PHB z białkiem gE stawia pod znakiem zapytania wyniki Watanabe i wsp. [341], jednak może być tłumaczone dłuższym czasem infekcji lub zastosowaniem innego szczepu HSV-1 niż w badaniach Md Firoz Ahmeda. Do tej pory interakcje białek mitochondrialnych i wirusowych zostały potwierdzone dla dwóch białek tegumentu – UL12.5 [487] oraz UL7 [488] oraz w badaniach nad interaktomem glikoproteiny gH [489] oraz VP16 [490]. W przypadku glikoprotein osłonkowych, poza

badaniami proteomicznymi, nie stwierdzono do tej pory w literaturze ani ich lokalizacji w mitochondriach ani wpływu na funkcjonowanie tych organelli. Biorąc pod uwagę fakt, że białka mitochondrialne zostały wykryte w interaktomie białek gE i gH HSV-1, można wysnuć wniosek, iż glikoproteiny mogą modulować funkcje mitochondriów. Alternatywnie powyższa interakcja może być skutkiem użycia zbyt silnego detergentu do lizy lub zbyt długiego traktowania nim komórek, co mogło doprowadzić do uwolnienia treści mitochondriów i „przypadkowego” kontaktu białek wirusowych i mitochondrialnych. W eksperymentach przeprowadzonych przez Ahmeda, do lizy został wykorzystany detergent NP-40, który w moich badaniach silnie degradował kompleks gE/gI w trakcie lizy komórek bydlęcych, co mogło przełożyć się również na zerwanie oddziaływania z właściwymi białkami interaktomu. Ponadto we wszystkich przytoczonych w tym akapicie badaniach proteomicznych nie zastosowano pre-inkubacji lizatu komórkowego ze złożem przed właściwą immunoprecypitacją białek. Na tym etapie użyłam magnetycznych kulek blokujących, nieopłaszczonych przeciwciałami, które niwelowały niespecyficzne wiązanie białek do złoża. W mojej opinii, także ten czynnik mógł przełożyć się na ograniczenie ilości białek potencjalnego interaktomu gE, wykluczając z niego białka mitochondrialne (poza VPS13C).

Spośród zidentyfikowanych przeze mnie potencjalnych partnerów komórkowych gE największą wartość stosunku wzbogacania  $\log_2$  gE-GFP/KN oraz  $\log_2$  gE-GFP/gETM<sup>-</sup>-GFP zaobserwowałam dla PP1 $\alpha$ . Z perspektywy badania CTC, brak oddziaływania PP1 $\alpha$  z kompleksem ze skróconą formą białka gE był bardzo ważnym wynikiem, dlatego też w dalszej części pracy skupiłam się nad analizą właśnie tej interakcji.

Białkowa fosfataza 1 (PP1) posiada aktywność serynowo-treoninową i jest odpowiedzialna za większość reakcji defosforylacji białek w komórkach eukariotycznych. Jest to białko silnie konserwowane – podobieństwo sekwencji pomiędzy PP1 *Giardia lamblia* a homologiem ssaczym wynosi aż 72% [491]. W genomach ssaczych zidentyfikowano trzy geny kodujące cztery izoformy podjednostki katalitycznej PP1: PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta/\delta$  oraz dwa warianty splicingowe PP1 $\gamma$ 1 i PP1 $\gamma$ 2 [491]–[493]. Interaktom wszystkich izoform PP1 jest bardzo zróżnicowany. Wszystkie białka oddziałujące z PP1 to tzw. białka PIP (z ang. *PP1-interacting proteins*, PIPs). Wśród nich można wyróżnić setki substratów oraz białek regulatorowych oddziałujących z PP1 (z ang. *regulatory interactors of protein phosphatase one*, RIPPOs) [494], [495], dalej zwanymi białkami RIPPO. Białka RIPPO, po

związaniu podjednostki katalitycznej PP1, mogą wpływać na jej lokalizację wewnątrzkomórkową, zbliżając ją fizycznie do danego substratu, posiadać dodatkowe motywy dokujące, wpływając na specyfikę substratową lub działać jako inhibitory wiązania konkretnego substratu. Białka PIP można podzielić na dwie grupy na podstawie ich powinowactwa do podjednostki katalitycznej PP1. Grupa PIP wykazujących wysokie powinowactwo (przykładowo białko BRCA1) posiada motywy dokujące PP1, które warunkują formowanie stabilnych heterodimerów, nawet gdy są one defosforylowane. Natomiast PIP o niskim powinowactwie (przykładowo fosforylaza glikogenu) wykazują słabą interakcję z podjednostką katalityczną PP1 i zwykle potrzebują związanego z nią odpowiedniego białka RIPP0, zapewniającego dodatkowy motyw dokujący [496]. Motywy dokujące podjednostkę katalityczną PP1 są to krótkie sekwencje liniowe - do 10 reszt aminokwasowych, tzw. SLiMs (z ang. *small/short linear motifs*). Najlepiej poznanymi motywami SLiM są RVxF, SILK oraz MyPhoNE. Najczęściej występującym motywem dokującym PP1 jest motyw RVxF, obecny w ok. 90% zwalidowanych eksperymentalnie białek PIP [497]. Jego sekwencja konsensusowa to K/R K/R V/I x F/W, gdzie x to jakakolwiek reszta aminokwasowa różna od Phe, Ile, Met, Tyr, Asp lub Pro. Związanie za pośrednictwem tego motywu nie zmienia konformacji podjednostki katalitycznej PP1, ale jest kluczowe dla właściwej aktywności i specyfiki substratowej holoenzymu. Szacuje się, że około 450 genów ssaczy koduje białka PIP z funkcjonalnym motywem RVxF [494]. Motyw SILK posiada sekwencję konsensusową G/S I L R/K i zlokalizowany jest zawsze N-końcowo w stosunku do motywu RVxF [498]. Podobnie jak motyw RVxF nie wpływa on na zmiany konformacyjne podjednostki katalitycznej PP1, a raczej jest on dodatkowym motywem dokującym substrat [498]–[500]. Sekwencja konsensusowa motywu MyPhoNE (z ang. *myosin phosphatase N-terminal element*) to R x x Q V/I/L K/R x Y/W, gdzie x to dowolna reszta aminokwasowa [498], [501]. Podobnie jak SILK, motyw MyPhoNE zlokalizowany jest N-terminalnie w stosunku do motywu RVxF. Dokowanie przy pomocy tego motywu wpływa na specyfikę substratową PP1.

Oddziaływanie PP1 z białkami wirusowymi zostało wykazane już w latach 90-tych ubiegłego wieku. He i wsp. dowiedli, że białko ICP34.5 ( $\gamma_{134.5}$ ) wirusa HSV-1 wiąże PP1 $\alpha$  przy pomocy motywu RVxF, co skutkuje defosforylacją podjednostki  $\alpha$  czynnika inicjacji translacji 2 (z ang. *eukaryotic initiation factor 2 subunit  $\alpha$* , eIF2 $\alpha$ ), doprowadzając do usunięcia blokady translacji wprowadzonej przez kinazę R w odpowiedzi na infekcję [439].



Z kolei Davis i wsp. wykazali, iż białko V wirusa odry efektywnie wychwytuje PP1 $\alpha/\gamma$ , powstrzymując defosforylację MDA5 (z ang. *melanoma differentiation-associated gene 5*), które jest kluczowym białkiem przeciwwirusowej odporności wrodzonej [502]. Innym przykładem jest białko Tat wirusa HIV, które wiąże podjednostkę PP1 $\gamma$ , umożliwiając transkrypcję genów wirusowych [503]. Zarówno białko Tat, jak i V nie posiadają konserwowanej sekwencji motywu RVxF, lecz zidentyfikowano w ich sekwencjach aminokwasowych motywy RVxF-podobne (z ang. *RVxF-like motif*). Badacze eksperymentalnie ustalili, że motyw RVxF-podobny dokujący białko Tat ma sekwencję  $_{35}QVCF_{38}$ , natomiast białko V -  $_{288}RIWY_{291}$ . Badania Benedyk i wsp. pokazały oddziaływanie białka UL21 wirusa HSV-1 ze wszystkimi izomerami PP1 [429]. Zidentyfikowali oni również nowy motyw SLiM - TROPPO (z ang. *twenty-one recruitment of protein phosphatase one*), o konserwowanej wśród alfaherpeswirusów sekwencji  $\phi$  S x F V Q V/I K/R x I, gdzie  $\phi$  to hydrofobowa reszta aminokwasowa, a x to dowolna reszta aminokwasowa.

W kolejnym eksperymencie potwierdziłam, że zachodzi koimmunoprecypitacja fosfatazy PP1 $\alpha$  z gE-GFP oraz gI w trzech typach komórek bydlęcych, co wykluczyło ograniczenie oddziaływania tylko do transformowanych nowotworowo komórek MDBK, które wykorzystałam do oznaczeń w spektrometrze masowym.

Następnie przeprowadziłam analizę kolokalizacji wewnątrzkomórkowej PP1 $\alpha$  i gE-GFP oraz zbadałam oddziaływania gE-PP1 $\alpha$  w sześciu punktach czasowych od infekcji. W kontekście badania transmisji na drodze CTC, moją hipotezą wyjściową było znalezienie takiego białka komórkowego, które będzie oddziaływało z kompleksem gE/gI w połączeniach komórkowych. Dlatego też analizę proteomiczną przeprowadziłam dopiero po 18 hpi. Wykazałam metodą barwienia immunofluorescencyjnego, że fosfataza kolokalizowała z glikoproteiną gE w obrębie błony komórkowej oraz w połączeniach komórkowych typu TNT, co może być ciekawym punktem wyjściowym do dalszego badania wpływu interakcji na ten typ CTC. Zaskakującym wynikiem była koimmunoprecypitacja PP1 $\alpha$  z gE-GFP oraz gI już od 8 hpi, czyli na początku produkcji glikoproteiny gE-GFP w zainfekowanych komórkach, gdy zlokalizowana jest ona głównie w aparacie Golgiego. Sugeruje to, iż oddziaływanie PP1 $\alpha$  z gE było stabilne i niezależne od lokalizacji kompleksu gE/gI w zainfekowanych komórkach. Utrzymująca się interakcja na każdym etapie infekcji BHV-1 mogła także wskazywać na to, iż kompleks gE/gI mógł być białkiem PIP o silnym powinowactwie do PP1 $\alpha$ . By sprawdzić tę hipotezę,

przeprowadziłam analizę sekwencji aminokwasowej gE oraz gI w celu znalezienia potencjalnych motywów SLiM. Ze względu na brak koimmunoprecypitacji PP1 $\alpha$  z gETM-GFP, najbardziej prawdopodobnym miejscem lokalizacji motywu SLiM była domena cytoplazmatyczna glikoproteiny gE. Nie stwierdziłam jednak obecności motywu RVxF w sekwencji obu analizowanych glikoprotein. Spośród wszystkich znanych motywów SLiM, zidentyfikowałam jedynie SILK na C-końcu białka gE, o sekwencji <sup>572</sup>SILR<sup>575</sup>. Ponieważ na motyw SILK składały się w tym przypadku cztery końcowe reszty aminokwasowe, wątpliwe by był to funkcjonalny motyw dokujący. W literaturze do tej pory nie udowodniono, by motyw SILK wiązał PP1 bez zlokalizowanego na C-końcu białka motywu RVxF lub IDoHA [497]. Inną możliwością wykorzystania motywu SILK mogło być oddziaływanie gE, PP1 oraz trzeciego białka PIP. Jednak zwykle w takim przypadku holoezycznym składa się z podjednostki katalitycznej, białka determinującego specyfikę substratową oraz inhibitora [497]. Biorąc pod uwagę przytoczone w poprzednim akapicie przykłady motywów RVxF-podobnych oraz nowego motywu TROPPO, możliwe, że w sekwencji aminokwasowej gE może znajdować się do tej pory niepoznany motyw SLiM.

Idąc tym tropem, w kolejnym etapie pracy eksperymentalnej postanowiłam sprawdzić, czy białko gE oddziałuje bezpośrednio z PP1 $\alpha$ . Do tego celu wykorzystałam komercyjny system dwuhybrydowy - F2H<sup>®</sup> (Chromotek), którego działanie opisałam w podrozdziale **8.2.3.4** oraz plazmidy niosące gen kodujący gE-GFP lub PP1 $\alpha$ -mCherry pod kontrolą promotora HCMV, umożliwiającego ekspresję genów w komórkach ssaczych. Uzyskane wyniki jednoznacznie pokazały, że białko gE-GFP nie oddziaływało bezpośrednio z PP1 $\alpha$ . Eksperyment przeprowadziłam w dołączonych do zestawu komórkach F2H<sup>®</sup>-BHK, które nie są permissywne dla wirusa BHV-1 (dane niepokazane). By wykluczyć efekt „obcego” środowiska dla interakcji gE-PP1 $\alpha$ , wynik postanowiłam potwierdzić także w bydłych fibroblastach, zarówno w koimmunoprecypitacji, jak i w analizie mikroskopowej kolokalizacji białek w komórkach transfekowanych tymi samymi plazmidami. W obu eksperymentach nie stwierdziłam bezpośredniej interakcji gE z PP1 $\alpha$ .

W świetle wcześniej uzyskanych przeze mnie wyników, brak bezpośredniego oddziaływania gE oraz PP1 $\alpha$ , nie wyklucza tej glikoproteiny jako potencjalnego białka PIP. Możliwe jest, że do interakcji z PP1 $\alpha$ , gE musi pozostawać w kompleksie z gI i/lub z innym białkiem wirusowym, czego potwierdzeniem była kolokalizacja gE/gI oraz PP1 $\alpha$  w błonie komórek infekowanych BHV-1. Kandydatem na inne białko PIP oddziałujące z gE oraz PP1 $\alpha$

może być UL21. Na korzyść tej hipotezy, poza wspomnianymi już badaniami Benedyk i wsp. [429], przemawiają także dowody na pośrednią interakcję gE z UL21 w procesie transmisji wirusa HSV-1 *in vitro* [111], [504]. UL21 jest wielofunkcyjnym białkiem oraz konserwowanym elementem struktury tegumentu alfa herpeswirusów. Jest ono zaangażowane między innymi w opuszczenie jądra przez kapsydy, formując kompleks z wirusowym białkiem UL16. Wg badań Han i wsp. kompleks UL21/UL16 bierze także udział w opłaszczeniu wirionów osłonką ostateczną poprzez oddziaływanie z UL11 oraz z domeną cytoplazmatyczną gE [111]. Dane z eksperymentów typu „pull-down” oraz obrazowania kolokalizacji białek w komórkach transfekowanych wykazały, iż UL11 nie wiąże się z UL21 bez obecności UL16 w komórce, natomiast UL16 nie oddziałuje z UL11 i gE bez UL21. Han i wsp. nie stwierdzili bezpośredniego oddziaływania gE oraz UL21 w komórkach transfekowanych na podstawie frakcjonowania białek poprzez wirowanie w gradiencie sacharozy, co jednak powinno być dodatkowo potwierdzone inną metodą. Pozostają pytania czy wspomniane białka tegumentu oddziałują z gE w połączeniach międzykomórkowych czy tylko na etapie opłaszczania wirionów osłonką ostateczną i czy komponentem kompleksu gE/UL11/UL16/UL21 może być także PP1 $\alpha$ ? Benedyk i wsp. pokazali, że łyśinki formowane przez wirusa HSV-1  $\Delta$ UL21 oraz rekombinanty z mutacjami punktowymi w motywie TROPPO są w znacznym stopniu zmniejszone w odniesieniu do wirusa WT, co może świadczyć o roli interakcji UL21 - PP1 $\alpha$  w CTC [429]. Dla ustalenia, czy faktycznie dochodzi do interakcji gE, UL21 oraz PP1 $\alpha$  w komórkach infekowanych wirusem BHV-1, konieczna jest analiza proteomiczna białek wirusowych interaktomu gE lub UL21.

W przyszłości, aby sprawdzić ewentualną bezpośrednią interakcję gE, UL21 i PP1 $\alpha$ , chciałabym powtórzyć koimmunoprecypitację białek oddziałujących z gE z immunodetekcją UL21 oraz przeprowadzić analizę proteomiczną białek wirusowych interaktomu tej glikoproteiny. W kolejnych eksperymentach planuję również skonstruować serię rekombinantów wirusowych z usuniętymi fragmentami domeny cytoplazmatycznej gE, w tym motywu SILK.

Potrzebne są również dodatkowe badania, by ustalić, czy gE jest białkiem RIPPO czy substratem dla PP1 $\alpha$ . Analiza potencjalnych miejsc fosforylacji domeny cytoplazmatycznej gE BHV-1 wykonana przez Yezid i wsp. pokazała, że istnieje sześć reszt aminokwasowych seryny, które mogą jej ulegać [227]. Metodą spektrometrii masowej współautorzy potwierdzili fosforylację jednej reszty seryny w sekwencji  ${}_{478}\text{VVVPV}\underline{\text{S}}\text{DDE}_{486}$ .

Konstrukcja rekombinantów wirusowych posiadających substytucje seryny w domenie cytoplazmatycznej gE pomogłaby w odpowiedzi na pytanie, czy któreś z pozostałych pięciu miejsc ulega defosforylacji przez PP1 $\alpha$  i jaki ma to wpływ na rozprzestrzenianie się wirusa na drodze CTC.

Po potwierdzeniu interakcji białek wirusowych i komórkowych, w kolejnych eksperymentach powinien zostać zbadany wpływ delekcji i nadekspresji genu kodującego dane białko komórkowe na przebieg infekcji. W przypadku PP1 $\alpha$  ten aspekt badań okazał się bardzo problematyczny i dlatego tych wyników nie przedstawiłam w pracy. Całkowity „knock-out” genu *PP1CA* jest letalny dla komórek, dlatego podjęłam próby zahamowania aktywności PP1 $\alpha$  poprzez użycie selektywnego inhibitora – tautomycetyny oraz poprzez wyciszenie ekspresji genu przez siRNA. Użycie odpowiedniej ilości tautomycetyny do zahamowania PP1 $\alpha$  okazało się toksyczne dla komórek. Natomiast wyciszenie ekspresji genu przy pomocy trzech syntetycznych konstruktów siRNA w różnych konfiguracjach, nie dało na tyle powtarzalnych wyników, by ocenić wpływ zmniejszonej ilości PP1 $\alpha$  na przebieg CTC wirusa BHV-1. Przeprowadziłam również serię eksperymentów z nadekspresją genu *PP1CA*, w komórkach transfekowanych plazmidem pEGFP(C1)-PP1 $\alpha$  i infekowanych BHV-1 WT oraz BHV-1 gETM<sup>-</sup> przed lub po transfekcji. Jako kontroli używałam plazmidu pEGFP-C1. Analizę przeprowadziłam modulując również czas pomiędzy infekcją a transfekcją. Wyniki, które otrzymałam wskazywały bardziej na hamowanie infekcji poprzez nadprodukcję białek, niż na rzeczywisty wpływ PP1 $\alpha$  na rozprzestrzenianie się BHV-1 na drodze CTC. Na korzyść takiej interpretacji również przemawia obserwacja zmniejszonej średnio o połowę liczby łysinek w porównaniu do nietraktowanej kontroli zarówno dla wirusa typu dzikiego jak i BHV-1 gETM<sup>-</sup>.

Pozostaje pytanie: czy któraś ze znanych funkcji PP1 $\alpha$  mogłaby łączyć się z rolą kompleksu gE/gI w transmisji wirusa na drodze CTC? Jak już wspominałam w podrozdziałach **4.2.2** oraz **4.3.4.1**, kompleks gE/gI jest zaangażowany w sortowanie wirionów do połączeń komórkowych po stronie podstawno-bocznej komórek, w czym decydującą rolę pełni domena cytoplazmatyczna gE. Potencjalnym punktem styczności oddziaływania gE/gI oraz PP1 $\alpha$  może być rola tej fosfatazy w stabilizacji połączeń ścisłych oraz w utrzymaniu właściwej polaryzacji komórek. Badania Traweger i wsp. wykazały, że PP1 $\alpha$  oddziałuje z białkiem Par-3 (z ang. *partitioning defective-3*), zlokalizowanym w części wierzchołkowej połączeń komórkowych [505]. Formowanie połączeń ścisłych oraz podział

błony na część wierzchołkową i podstawno-boczną są regulowane przez aktywność kinaz serynowo-treoninowych aPKC (z ang. *atypical protein kinase C*) oraz Par-1 (z ang. *partitioning defective-1*). Kinaza aPKC stabilizuje błonę wierzchołkową poprzez fosforylację białkowych determinantów błony podstawno-bocznej, tj. Lgl (z ang. *lethal giant larvae protein*) oraz Par-1. Natomiast po stronie podstawno-bocznej Par-1 fosforyluje Par-3, co promuje wiązanie białek 14-3-3, uniemożliwiając oddziaływanie Par-3 z aPKC, które jest kluczowe do ustanowienia strony apikalnej komórek. Dodatkowo fosforylacja Par-3 przez aPKC blokuje formowanie kompleksu aPKC/Par-3. Wg autorów PP1 $\alpha$  umożliwia „recykling” zablokowanego po stronie podstawno-bocznej Par-3, poprzez jego defosforylację, gdy tylko zniknie ono z „zasięgu” Par-1, umożliwiając jego ponowne oddziaływanie z aPKC po stronie wierzchołkowej błony komórkowej. Pośrednim dowodem na właśnie taki mechanizm interakcji mogą być badania Kramer i wsp., w których stwierdzono obecność PP1 $\alpha$  oraz białka 14-3-3 w wirionach PRV [12]. Do stwierdzenia, czy gE/gI wpływa na sortowanie wirionów potomnych poprzez interakcję z PP1 $\alpha$  w kontekście oddziaływania z aPKC/Par-3 i czy transmisja na drodze CTC może zachodzić na skutek defektu formowania połączeń ścisłych potrzebne są oczywiście dodatkowe badania.

W świetle publikacji z ostatnich kilku lat oraz uzyskanych w niniejszej pracy wyników, badanie oddziaływania białek wirusowych oraz fosfataz komórkowych wydaje się słusznym kierunkiem w lepszym poznaniu transmisji na drodze CTC. We wspomnianych kilkakrotnie w tym rozdziale badaniach Benedyk i wsp. wykazano również ciekawy efekt mutacji kompensacyjnych w kinazie US3 przy defekcie interakcji PP1 $\alpha$  i białka UL21. Powyższa adaptacja pojawiała się po kilku pasażach wirusa i promowała niezakończoną transmisję wirusa HSV-1, mierzoną testem wielkości łysinek wirusowych, co wskazuje na udział tej interakcji w CTC [429]. Z kolei w badaniach Carmichel i wsp. pokazano bezpośredni wpływ białkowej fosfatazy tyrozynowej (PTP1B) na CTC wirusa HSV-1. W komórkach traktowanych specyficznym inhibitorem dochodziło do znacznego zahamowania rozprzestrzeniania się wirusa tą drogą infekcji przy niezakończonym mianie wirusa zewnątrzkomórkowego [375]. Autorzy udowodnili również, że inaktywacja tej fosfatazy nie wpływa na dystrybucję gE w połączeniach komórkowych, co może wskazywać na zaangażowanie wielu fosfataz w regulację procesu CTC.

W toku pracy badawczej podjęłam również próbę potwierdzenia oddziaływania glikoproteiny gE z pozostałymi białkami potencjalnego interaktomu. Jednak ze względu na ograniczoną dostępność komercyjnych przeciwciał swoistych wobec antygenów bydłych, nie udało mi się potwierdzić ani wykluczyć tych interakcji.

Podsumowując, podjęte badania przyczyniły się do dokładniejszego poznania procesu CTC wirusa BHV-1, a w szczególności jego dynamiki oraz roli białek wirusowych i komórkowych w tym typie transmisji. Wyniki te potwierdzają, iż proces CTC herpeswirusów opiera się na skomplikowanej sieci interakcji białkowych, zależnych w dużej mierze od równowagi aktywności kinaz wirusowych oraz fosfataz komórkowych, jak również potencjalnych mutacji kompensacyjnych, które niwelują upośledzenie tak ważnej drogi infekcji. Biorąc pod uwagę fakt, iż PP1 $\alpha$  jest silnie konserwowanym białkiem wśród kręgowców, interakcja z tą fosfatazą może być uniwersalna dla różnych gatunków herpeswirusów. Konserwowany międzygatunkowo mechanizm tej drogi infekcji dałby możliwość opracowania nowych, skutecznych leków w terapii chorób powodowanych przez alfaherpeswirusy.

## 10. Wnioski

- Opracowano test na określenie prędkości bezpośredniego transportu międzykomórkowego (CTC), który może być uniwersalnie stosowany do szacowania tempa rozprzestrzeniania się wirusów na tej drodze infekcji w różnych rodzajach komórek. W odróżnieniu od klasycznego testu wielkości łysinek, analiza prędkości CTC pozwoliła określić dynamikę procesu w każdej godzinie obserwacji oraz dała powtarzalne wyniki, obarczone niską wartością odchylenia standardowego.
- Test prędkości CTC uwidoczniał wpływ delekcji genu kodującego kinazę US3 na obniżenie tempa transmisji wirusa BHV-1 w 9 hpi, który został zniwelowany po 12 hpi. Analiza filmów poklatkowych pokazała również opóźnienie czasu translokacji gE-GFP do połączeń komórkowych w komórkach infekowanych mutantami BHV-1 pozbawionymi aktywności kinazy (BHV-1  $\Delta$ US3 oraz BHV-1 US3KD). Zredukowanie efektu mutacji US3 po 12 hpi może sugerować mechanizm kompensacyjny, pozwalający na utrzymanie CTC na poziomie porównywalnym do wirusa WT.
- Infekcja podwójnie znakowanym rekombinantem BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry pozwoliła na śledzenie transportu elementów strukturalnych wirusa w międzykomórkowych nanorurkach. Mikroskopowa analiza przyżyciowa wskazała, iż białka kapsydu oraz osłonki transportowane są oddzielnie w tych strukturach.
- W analizie proteomicznej partnerów komórkowych glikoproteiny gE zidentyfikowano 17 białek potencjalnego interaktomu, w tym sześć o lokalizacji błonowej. Największą wartość stosunku wzbogacania wykazano dla podjednostki  $\alpha$  białkowej fosfatazy 1 (PP1 $\alpha$ ).
- Pomimo braku bezpośredniej interakcji gE- PP1 $\alpha$ , ze względu na kolokalizację tych białek w błonie komórkowej i strukturach TNT oraz koimmunoprecypitację niezależną od czasu infekcji, można stwierdzić, iż glikoproteina gE jest białkiem oddziałującym z PP1 (PIP). Potrzebne są dodatkowe badania, aby ustalić: (I) czy gE wiąże PP1 $\alpha$  za pomocą motywu SILK; (II) czy w sekwencji gE znajduje się nowy motyw SLiM; (III) jakie inne białka są potrzebne do interakcji gE- PP1 $\alpha$ ; (IV) jaki jest

charakter oddziaływania gE-PP1 $\alpha$  (substrat czy białko regulatorowe oddziałujące z PP1 - RIPPO) oraz (V) czy interakcja wpływa na sortowanie wirionów na powierzchnię podstawno-boczną błony komórkowej i/lub jej polaryzację.



## 11. Bibliografia

- [1] J. Grimes, K. Fagerberg, i L. Smith, *Sexually transmitted disease: an encyclopedia of diseases, prevention, treatment, and issues*. Santa Barbara, California: Greenwood, 2014.
- [2] M. Longson, „Persistence in herpes simplex virus infections”, *Postgrad. Med. J.*, t. 54, nr 635, s. 603–612, wrz. 1978, doi: 10.1136/pgmj.54.635.603.
- [3] B. Roizman, D. M. Knipe, i R. Whitley, „Herpes Simplex Viruses”, w *Fields Virology*, 6th ed., B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, i Inc. Ovid Technologies, Red. Philadelphia ; London: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, s. 1823–1897.
- [4] „Herpes simplex virus”. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus> (dostęp 2 kwiecień 2020).
- [5] P. J. Walker *i in.*, „Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019)”, *Arch. Virol.*, t. 164, nr 9, s. 2417–2429, wrz. 2019, doi: 10.1007/s00705-019-04306-w.
- [6] P. J. Walker *i in.*, „Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020)”, *Arch. Virol.*, t. 165, nr 11, s. 2737–2748, lis. 2020, doi: 10.1007/s00705-020-04752-x.
- [7] P. Pellett i B. Roizman, „Herpesviridae”, w *Fields Virology*, 6th ed., B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, i Inc. Ovid Technologies, Red. Philadelphia ; London: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, s. 1802–1822.
- [8] A. J. Davison, „Herpesvirus systematics”, *Vet. Microbiol.*, t. 143, nr 1, s. 52–69, cze. 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.014.
- [9] D. J. McGeoch i D. Gatherer, „Integrating Reptilian Herpesviruses into the Family Herpesviridae”, *J. Virol.*, t. 79, nr 2, s. 725, sty. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.2.725-731.2005.
- [10] X. Dai i Z. H. Zhou, „Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes”, *Science*, t. 360, nr 6384, s. eaao7298, kwi. 2018, doi: 10.1126/science.aao7298.
- [11] M.-T. Sciortino, M. Suzuki, B. Taddeo, i B. Roizman, „RNAs Extracted from Herpes Simplex Virus 1 Virions: Apparent Selectivity of Viral but Not Cellular RNAs Packaged in Virions”, *J. Virol.*, t. 75, nr 17, s. 8105–8116, wrz. 2001, doi: 10.1128/JVI.75.17.8105-8116.2001.
- [12] T. Kramer, T. M. Greco, L. W. Enquist, i I. M. Cristea, „Proteomic Characterization of Pseudorabies Virus Extracellular Virions”, *J. Virol.*, t. 85, nr 13, s. 6427–6441, lip. 2011, doi: 10.1128/JVI.02253-10.
- [13] R. Lippé, „Characterization of extracellular HSV-1 virions by proteomics”, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, t. 1144, s. 181–190, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-0428-0\_12.
- [14] G. Cardone *i in.*, „Visualization of the Herpes Simplex Virus Portal in situ by Cryo-electron Tomography”, *Virology*, t. 361, nr 2, s. 426–434, maj 2007, doi: 10.1016/j.virol.2006.10.047.
- [15] W. W. Newcomb, B. L. Trus, F. P. Booy, A. C. Steven, J. S. Wall, i J. C. Brown, „Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes”, *J. Mol. Biol.*, t. 232, nr 2, s. 499–511, lip. 1993, doi: 10.1006/jmbi.1993.1406.
- [16] W. H. Roos, K. Radtke, E. Kniesmeijer, H. Geertsema, B. Sodeik, i G. J. L. Wuite, „Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 106, nr 24, s. 9673–9678, cze. 2009, doi: 10.1073/pnas.0901514106.
- [17] J. Snijder *i in.*, „Vertex-Specific Proteins pUL17 and pUL25 Mechanically Reinforce Herpes Simplex Virus Capsids”, *J. Virol.*, t. 91, nr 12, 15 2017, doi: 10.1128/JVI.00123-17.
- [18] B. L. Trus *i in.*, „Allosteric Signalling and a Nuclear Exit Strategy: Binding of UL25/ UL17 Heterodimers to DNA-filled HSV-1 Capsids”, s. 20, 2007.
- [19] K. Toropova, J. B. Huffman, F. L. Homa, i J. F. Conway, „The Herpes Simplex Virus 1 UL17 Protein Is the Second Constituent of the Capsid Vertex-Specific Component Required for DNA Packaging and Retention”, *J. Virol.*, t. 85, nr 15, s. 7513–7522, sie. 2011, doi: 10.1128/JVI.00837-11.
- [20] W. H. Fan, A. P. E. Roberts, M. McElwee, D. Bhella, F. J. Rixon, i R. Lauder, „The large tegument protein pUL36 is essential for formation of the capsid vertex-specific component at the capsid-

- tegument interface of herpes simplex virus 1", *J. Virol.*, t. 89, nr 3, s. 1502–1511, luty 2015, doi: 10.1128/JVI.02887-14.
- [21] A. Huet, A. M. Makhov, J. B. Huffman, M. Vos, F. L. Homa, i J. F. Conway, „Extensive subunit contacts underpin herpesvirus capsid stability and interior-to-exterior allostery”, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, t. 23, nr 6, s. 531–539, 2016, doi: 10.1038/nsmb.3212.
- [22] Y. T. Liu *i in.*, „A pUL25 dimer interfaces the pseudorabies virus capsid and tegument”, *J. Gen. Virol.*, t. 98, nr 11, s. 2837–2849, lis. 2017, doi: 10.1099/jgv.0.000903.
- [23] D. W. Bauer, J. B. Huffman, F. L. Homa, i A. Evilevitch, „Herpes Virus Genome, The Pressure Is On”, *J. Am. Chem. Soc.*, t. 135, nr 30, s. 11216–11221, lip. 2013, doi: 10.1021/ja404008r.
- [24] P. G. Spear i B. Roizman, „Proteins Specified by Herpes Simplex Virus V. Purification and Structural Proteins of the Herpesvirion”, *J. Virol.*, t. 9, nr 1, s. 143–159, sty. 1972, Dostęp: 18 października 2020. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC356272/>
- [25] A. J. Stevenson, E. E. Morrison, R. Chaudhari, C. C. Yang, i D. M. Meredith, „Processing and intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 proteinase”, *J. Gen. Virol.*, t. 78 ( Pt 3), s. 671–675, mar. 1997, doi: 10.1099/0022-1317-78-3-671.
- [26] S. Person i P. Desai, „Capsids are formed in a mutant virus blocked at the maturation site of the UL26 and UL26.5 open reading frames of herpes simplex virus type 1 but are not formed in a null mutant of UL38 (VP19C)”, *Virology*, t. 242, nr 1, s. 193–203, mar. 1998, doi: 10.1006/viro.1997.9005.
- [27] A. K. Sheaffer *i in.*, „Herpes Simplex Virus DNA Cleavage and Packaging Proteins Associate with the Procapsid prior to Its Maturation”, *J. Virol.*, t. 75, nr 2, s. 687–698, sty. 2001, doi: 10.1128/JVI.75.2.687-698.2001.
- [28] S. Loret, G. Guay, i R. Lippé, „Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions”, *J. Virol.*, t. 82, nr 17, s. 8605–8618, wrz. 2008, doi: 10.1128/JVI.00904-08.
- [29] W. W. Newcomb *i in.*, „Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation”, *J. Mol. Biol.*, t. 263, nr 3, s. 432–446, lis. 1996, doi: 10.1006/jmbi.1996.0587.
- [30] F. J. Rixon i D. McNab, „Packaging-Competent Capsids of a Herpes Simplex Virus Temperature-Sensitive Mutant Have Properties Similar to Those of In Vitro-Assembled Procapsids”, *J. Virol.*, t. 73, nr 7, s. 5714–5721, lip. 1999, Dostęp: 18 października 2020. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112631/>
- [31] W. W. Newcomb *i in.*, „Isolation of herpes simplex virus procapsids from cells infected with a protease-deficient mutant virus”, *J. Virol.*, t. 74, nr 4, s. 1663–1673, luty 2000, doi: 10.1128/jvi.74.4.1663-1673.2000.
- [32] V. Jovasevic, L. Liang, i B. Roizman, „Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus”, *J. Virol.*, t. 82, nr 7, s. 3311–3319, kwi. 2008, doi: 10.1128/JVI.01919-07.
- [33] B. Roizman i D. Furlong, „The Replication of Herpesviruses”, w *Reproduction: DNA Animal Viruses*, H. Fraenkel-Conrat i R. R. Wagner, Red. Boston, MA: Springer US, 1974, s. 229–403. doi: 10.1007/978-1-4684-2703-5\_4.
- [34] C. Crump, „Virus Assembly and Egress of HSV”, *Adv. Exp. Med. Biol.*, t. 1045, s. 23–44, 2018, doi: 10.1007/978-981-10-7230-7\_2.
- [35] I. B. Hogue, „Tegument Assembly, Secondary Envelopment and Exocytosis”, w *Alphaherpesviruses: Molecular Biology, Host Interactions and Control*, Caister Academic Press, 2020. doi: 10.21775/9781913652555.09.
- [36] G. A. Smith, „Navigating the Cytoplasm: Delivery of the Alphaherpesvirus Genome to the Nucleus”, w *Alphaherpesviruses: Molecular Biology, Host Interactions and Control*, Caister Academic Press, 2020. doi: 10.21775/9781913652555.03.
- [37] I. Frank i H. M. Friedman, „A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G.”, *J. Virol.*, t. 63, nr 11, s. 4479–4488, lis. 1989, Dostęp: 16 sierpień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC251078/>

- [38] L. M. Hook, J. Huang, M. Jiang, R. Hodinka, i H. M. Friedman, „Blocking antibody access to neutralizing domains on glycoproteins involved in entry as a novel mechanism of immune evasion by herpes simplex virus type 1 glycoproteins C and E”, *J. Virol.*, t. 82, nr 14, s. 6935–6941, lip. 2008, doi: 10.1128/JVI.02599-07.
- [39] D. G. Meckes i J. W. Wills, „Dynamic interactions of the UL16 tegument protein with the capsid of herpes simplex virus”, *J. Virol.*, t. 81, nr 23, s. 13028–13036, grudz. 2007, doi: 10.1128/JVI.01306-07.
- [40] S. L. Oliver, E. Yang, i A. M. Arvin, „Varicella-Zoster Virus Glycoproteins: Entry, Replication, and Pathogenesis”, *Curr. Clin. Microbiol. Rep.*, t. 3, nr 4, s. 204–215, grudz. 2016, doi: 10.1007/s40588-016-0044-4.
- [41] E. Mocarski, „Comparative analysis of herpesvirus-common proteins”, w *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, i K. Yamanishi, Red. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. Dostęp: 17 sierpień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47403/>
- [42] M. Vallbracht, M. Backovic, B. G. Klupp, F. A. Rey, i T. C. Mettenleiter, „Chapter Seven - Common characteristics and unique features: A comparison of the fusion machinery of the alphaherpesviruses Pseudorabies virus and Herpes simplex virus”, w *Advances in Virus Research*, t. 104, M. Kielian, T. C. Mettenleiter, i M. J. Roossinck, Red. Academic Press, 2019, s. 225–281. doi: 10.1016/bs.aivir.2019.05.007.
- [43] B. Roizman i P. L. Ward, „Simplexvirus†”, w *The Springer Index of Viruses*, C. Tidona i G. Darai, Red. New York, NY: Springer, 2011, s. 663–670. doi: 10.1007/978-0-387-95919-1\_93.
- [44] C. L. Keeler, „Iltovirus”, w *The Springer Index of Viruses*, C. Tidona i G. Darai, Red. New York, NY: Springer, 2011, s. 643–648. doi: 10.1007/978-0-387-95919-1\_91.
- [45] V. Zelnik, H.-J. Kung, i J. Kamil, „Mardivirus”, w *The Springer Index of Viruses*, C. Tidona i G. Darai, Red. New York, NY: Springer, 2011, s. 649–661. doi: 10.1007/978-0-387-95919-1\_92.
- [46] K. Osterrieder i T. C. Mettenleiter, „Varicellovirus”, w *The Springer Index of Viruses*, C. Tidona i G. Darai, Red. New York, NY: Springer, 2011, s. 671–678. doi: 10.1007/978-0-387-95919-1\_94.
- [47] F. C. Oraggi *i in.*, „A Genomic Approach to Unravel Host-Pathogen Interaction in Chelonians: The Example of Testudinid Herpesvirus 3”, *PLOS ONE*, t. 10, nr 8, s. e0134897, sie. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0134897.
- [48] A. J. Davison, „Comparative analysis of the genomes”, w *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, i K. Yamanishi, Red. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. Dostęp: 17 sierpień 2021. [Online]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47439/>
- [49] K. Osterrieder i J.-F. Vautherot, „3 - The genome content of Marek’s disease-like viruses”, w *Marek’s Disease*, F. Davison i V. Nair, Red. Oxford: Academic Press, 2004, s. 17–31. doi: 10.1016/B978-012088379-0/50007-4.
- [50] E. Thiry *i in.*, „Recombination in alphaherpesviruses”, *Rev. Med. Virol.*, t. 15, nr 2, s. 89–103, mar. 2005, doi: 10.1002/rmv.451.
- [51] B. C. Herold, R. J. Visalli, N. Susmarski, C. R. Brandt, i P. G. Spear, „Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B”, *J. Gen. Virol.*, t. 75 ( Pt 6), s. 1211–1222, cze. 1994, doi: 10.1099/0022-1317-75-6-1211.
- [52] B. C. Herold, D. WuDunn, N. Soltys, i P. G. Spear, „Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity”, *J. Virol.*, t. 65, nr 3, s. 1090–1098, mar. 1991, doi: 10.1128/JVI.65.3.1090-1098.1991.
- [53] S. Laquerre, R. Argnani, D. B. Anderson, S. Zucchini, R. Manservigi, i J. C. Glorioso, „Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread”, *J. Virol.*, t. 72, nr 7, s. 6119–6130, lip. 1998, doi: 10.1128/JVI.72.7.6119-6130.1998.
- [54] A. H. Rux, H. Lou, J. D. Lambris, H. M. Friedman, R. J. Eisenberg, i G. H. Cohen, „Kinetic Analysis of Glycoprotein C of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Binding to Heparin, Heparan Sulfate, and Complement Component C3b”, *Virology*, t. 294, nr 2, s. 324–332, mar. 2002, doi: 10.1006/viro.2001.1326.

- [55] S. Gruenheid, L. Gatzke, H. Meadows, i F. Tufaro, „Herpes simplex virus infection and propagation in a mouse L cell mutant lacking heparan sulfate proteoglycans”, *J. Virol.*, t. 67, nr 1, s. 93–100, sty. 1993, doi: 10.1128/JVI.67.1.93-100.1993.
- [56] T. M. Cairns i S. A. Connolly, „Entry of Alphaherpesviruses”, w *Alphaherpesviruses: Molecular Biology, Host Interactions and Control*, Caister Academic Press, 2020. doi: 10.21775/9781913652555.02.
- [57] F. Anderson *i in.*, „Targeting of viral capsids to nuclear pores in a cell-free reconstitution system”, *Traffic Cph. Den.*, t. 15, nr 11, s. 1266–1281, lis. 2014, doi: 10.1111/tra.12209.
- [58] A. M. Copeland, W. W. Newcomb, i J. C. Brown, „Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment”, *J. Virol.*, t. 83, nr 4, s. 1660–1668, luty 2009, doi: 10.1128/JVI.01139-08.
- [59] P. M. Ojala, B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, i A. Helenius, „Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 20, nr 13, s. 4922–4931, lip. 2000, doi: 10.1128/MCB.20.13.4922-4931.2000.
- [60] D. Padeloup, M. McElwee, F. Beilstein, M. Labetoulle, i F. J. Rixon, „Herpesvirus Tegument Protein pUL37 Interacts with Dystonin/BPAG1 To Promote Capsid Transport on Microtubules during Egress”, *J. Virol.*, t. 87, nr 5, s. 2857–2867, mar. 2013, doi: 10.1128/JVI.02676-12.
- [61] H. Granzow, F. Weiland, A. Jöns, B. G. Klupp, A. Karger, i T. C. Mettenleiter, „Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment”, *J. Virol.*, t. 71, nr 3, s. 2072–2082, mar. 1997, doi: 10.1128/JVI.71.3.2072-2082.1997.
- [62] A. Brandariz-Nuñez, T. Liu, T. Du, i A. Evilevitch, „Pressure-driven release of viral genome into a host nucleus is a mechanism leading to herpes infection”, *eLife*, t. 8, s. e47212, sie. 2019, doi: 10.7554/eLife.47212.
- [63] O. Kobiler i A. Afriat, „The Fate of Incoming HSV-1 Genomes Entering the Nucleus”, w *Alphaherpesviruses: Molecular Biology, Host Interactions and Control*, Caister Academic Press, 2020. doi: 10.21775/9781913652555.04.
- [64] E. B. Draganova, M. K. Thorsen, i E. E. Heldwein, „Nuclear Egress”, w *Alphaherpesviruses: Molecular Biology, Host Interactions and Control*, Caister Academic Press, 2020. doi: 10.21775/9781913652555.08.
- [65] D. Fan *i in.*, „The Role of VP16 in the Life Cycle of Alphaherpesviruses”, *Front. Microbiol.*, t. 11, s. 1910, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.01910.
- [66] S. K. Weller i D. M. Coen, „Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication”, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, t. 4, nr 9, s. a013011, wrz. 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a013011.
- [67] N. Panté i M. Kann, „Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~39 nm”, *Mol. Biol. Cell*, t. 13, nr 2, s. 425–434, luty 2002, doi: 10.1091/mbc.01-06-0308.
- [68] R. J. Roller, Y. Zhou, R. Schnetzer, J. Ferguson, i D. DeSalvo, „Herpes Simplex Virus Type 1 UL34 Gene Product Is Required for Viral Envelopment”, *J. Virol.*, t. 74, nr 1, s. 117–129, sty. 2000, Dostęp: 24 sierpień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC111520/>
- [69] A. E. Reynolds, B. J. Ryckman, J. D. Baines, Y. Zhou, L. Liang, i R. J. Roller, „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.*, t. 75, nr 18, s. 8803–8817, wrz. 2001, doi: 10.1128/jvi.75.18.8803-8817.2001.
- [70] W. Fuchs, B. G. Klupp, H. Granzow, N. Osterrieder, i T. C. Mettenleiter, „The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions”, *J. Virol.*, t. 76, nr 1, s. 364–378, sty. 2002, doi: 10.1128/jvi.76.1.364-378.2002.
- [71] C. Funk *i in.*, „The Herpes Simplex Virus Protein pUL31 Escorts Nucleocapsids to Sites of Nuclear Egress, a Process Coordinated by Its N-Terminal Domain”, *PLOS Pathog.*, t. 11, nr 6, s. e1004957, cze. 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004957.

- [72] I. B. Hogue, J. B. Bosse, J.-R. Hu, S. Y. Thiberge, i L. W. Enquist, „Cellular Mechanisms of Alpha Herpesvirus Egress: Live Cell Fluorescence Microscopy of Pseudorabies Virus Exocytosis”, *PLoS Pathog.*, t. 10, nr 12, s. e1004535, grudz. 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004535.
- [73] C. W. Stackpole, „Herpes-Type Virus of the Frog Renal Adenocarcinoma”, *J. Virol.*, t. 4, nr 1, s. 75–93, lip. 1969, Dostęp: 24 sierpień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC375840/>
- [74] A. E. Reynolds, E. G. Wills, R. J. Roller, B. J. Ryckman, i J. D. Baines, „Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids”, *J. Virol.*, t. 76, nr 17, s. 8939–8952, wrz. 2002, doi: 10.1128/jvi.76.17.8939-8952.2002.
- [75] A. A. Gershon, D. L. Sherman, Z. Zhu, C. A. Gabel, R. T. Ambron, i M. D. Gershon, „Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network.”, *J. Virol.*, t. 68, nr 10, s. 6372–6390, paź. 1994, Dostęp: 24 sierpień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC237058/>
- [76] B. G. Klupp, H. Granzow, i T. C. Mettenleiter, „Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product”, *J. Virol.*, t. 74, nr 21, s. 10063–10073, lis. 2000, doi: 10.1128/jvi.74.21.10063-10073.2000.
- [77] J. N. Skepper, A. Whiteley, H. Browne, i A. Minson, „Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway”, *J. Virol.*, t. 75, nr 12, s. 5697–5702, cze. 2001, doi: 10.1128/JVI.75.12.5697-5702.2001.
- [78] H. Granzow, B. G. Klupp, W. Fuchs, J. Veits, N. Osterrieder, i T. C. Mettenleiter, „Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study”, *J. Virol.*, t. 75, nr 8, s. 3675–3684, kwi. 2001, doi: 10.1128/JVI.75.8.3675-3684.2001.
- [79] A. E. Tollefson, A. Scaria, T. W. Hermiston, J. S. Ryerse, L. J. Wold, i W. S. Wold, „The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells”, *J. Virol.*, t. 70, nr 4, s. 2296–2306, kwi. 1996, doi: 10.1128/JVI.70.4.2296-2306.1996.
- [80] S. Cohen, A. K. Marr, P. Garcin, i N. Panté, „Nuclear envelope disruption involving host caspases plays a role in the parvovirus replication cycle”, *J. Virol.*, t. 85, nr 10, s. 4863–4874, maj 2011, doi: 10.1128/JVI.01999-10.
- [81] S. Raghava, K. M. Giorda, F. B. Romano, A. P. Heuck, i D. N. Hebert, „SV40 late protein VP4 forms toroidal pores to disrupt membranes for viral release”, *Biochemistry*, t. 52, nr 22, s. 3939–3948, cze. 2013, doi: 10.1021/bi400036z.
- [82] B. G. Klupp, H. Granzow, i T. C. Mettenleiter, „Nuclear Envelope Breakdown Can Substitute for Primary Envelopment-Mediated Nuclear Egress of Herpesviruses”, *J. Virol.*, t. 85, nr 16, s. 8285–8292, sie. 2011, doi: 10.1128/JVI.00741-11.
- [83] K. S. Grimm, B. G. Klupp, H. Granzow, F. M. Müller, W. Fuchs, i T. C. Mettenleiter, „Analysis of viral and cellular factors influencing herpesvirus-induced nuclear envelope breakdown”, *J. Virol.*, t. 86, nr 12, s. 6512–6521, cze. 2012, doi: 10.1128/JVI.00068-12.
- [84] M. Maric, A. C. Haugo, W. Dauer, D. Johnson, i R. J. Roller, „Nuclear envelope breakdown induced by herpes simplex virus type 1 involves the activity of viral fusion proteins”, *Virology*, t. 460–461, s. 128–137, lip. 2014, doi: 10.1016/j.virol.2014.05.010.
- [85] H. Leuzinger *i in.*, „Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways”, *J. Virol.*, t. 79, nr 20, s. 13047–13059, paź. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.20.13047-13059.2005.
- [86] P. Wild *i in.*, „Exploring the Nuclear Envelope of Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells by High-Resolution Microscopy”, *J. Virol.*, t. 83, nr 1, s. 408–419, sty. 2009, doi: 10.1128/JVI.01568-08.
- [87] H. Hofemeister i P. O’Hare, „Nuclear Pore Composition and Gating in Herpes Simplex Virus-Infected Cells”, *J. Virol.*, t. 82, nr 17, s. 8392–8399, wrz. 2008, doi: 10.1128/JVI.00951-08.
- [88] C.-H. Nagel *i in.*, „Nuclear Egress and Envelopment of Herpes Simplex Virus Capsids Analyzed with Dual-Color Fluorescence HSV1(17+)”, *J. Virol.*, t. 82, nr 6, s. 3109–3124, mar. 2008, doi: 10.1128/JVI.02124-07.
- [89] B. G. Klupp, W. Fuchs, H. Granzow, R. Nixdorf, i T. C. Mettenleiter, „Pseudorabies Virus UL36 Tegument Protein Physically Interacts with the UL37 Protein”, *J. Virol.*, t. 76, nr 6, s. 3065–3071, mar. 2002, doi: 10.1128/JVI.76.6.3065-3071.2002.

- [90] V. Vittone, E. Diefenbach, D. Triffett, M. W. Douglas, A. L. Cunningham, i R. J. Diefenbach, „Determination of Interactions between Tegument Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1”, *J. Virol.*, t. 79, nr 15, s. 9566–9571, sie. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.15.9566-9571.2005.
- [91] M. A. Bucks, K. J. O’Regan, M. A. Murphy, J. W. Wills, i R. J. Courtney, „Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids”, *Virology*, t. 361, nr 2, s. 316–324, maj 2007, doi: 10.1016/j.virol.2006.11.031.
- [92] D. H. Ko, A. L. Cunningham, i R. J. Diefenbach, „The Major Determinant for Addition of Tegument Protein pUL48 (VP16) to Capsids in Herpes Simplex Virus Type 1 Is the Presence of the Major Tegument Protein pUL36 (VP1/2)”, *J. Virol.*, t. 84, nr 3, s. 1397–1405, luty 2010, doi: 10.1128/JVI.01721-09.
- [93] S. Svobodova, S. Bell, i C. M. Crump, „Analysis of the interaction between the essential herpes simplex virus 1 tegument proteins VP16 and VP1/2”, *J. Virol.*, t. 86, nr 1, s. 473–483, sty. 2012, doi: 10.1128/JVI.05981-11.
- [94] G. Elliott, G. Mouzakis, i P. O’Hare, „VP16 interacts via its activation domain with VP22, a tegument protein of herpes simplex virus, and is relocated to a novel macromolecular assembly in coexpressing cells.”, *J. Virol.*, t. 69, nr 12, s. 7932–7941, grudz. 1995, Dostęp: 24 sierpień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC189738/>
- [95] K. Kato, T. Daikoku, F. Goshima, H. Kume, K. Yamaki, i Y. Nishiyama, „Synthesis, subcellular localization and VP16 interaction of the herpes simplex virus type 2 UL46 gene product”, *Arch. Virol.*, t. 145, nr 10, s. 2149–2162, 2000, doi: 10.1007/s007050070045.
- [96] K. Maringer, J. Stylianou, i G. Elliott, „A Network of Protein Interactions around the Herpes Simplex Virus Tegument Protein VP22”, *J. Virol.*, t. 86, nr 23, s. 12971–12982, grudz. 2012, doi: 10.1128/JVI.01913-12.
- [97] J. L. Starkey, J. Han, P. Chadha, J. A. Marsh, i J. W. Wills, „Elucidation of the Block to Herpes Simplex Virus Egress in the Absence of Tegument Protein UL16 Reveals a Novel Interaction with VP22”, *J. Virol.*, t. 88, nr 1, s. 110–119, sty. 2014, doi: 10.1128/JVI.02555-13.
- [98] W. Fuchs *i in.*, „Physical Interaction between Envelope Glycoproteins E and M of Pseudorabies Virus and the Major Tegument Protein UL49”, *J. Virol.*, t. 76, nr 16, s. 8208–8217, sie. 2002, doi: 10.1128/JVI.76.16.8208-8217.2002.
- [99] A. Farnsworth, T. W. Wisner, i D. C. Johnson, „Cytoplasmic Residues of Herpes Simplex Virus Glycoprotein gE Required for Secondary Envelopment and Binding of Tegument Proteins VP22 and UL11 to gE and gD”, *J. Virol.*, t. 81, nr 1, s. 319–331, sty. 2007, doi: 10.1128/JVI.01842-06.
- [100] M. J. Brignati, J. S. Loomis, J. W. Wills, i R. J. Courtney, „Membrane Association of VP22, a Herpes Simplex Virus Type 1 Tegument Protein”, *J. Virol.*, t. 77, nr 8, s. 4888–4898, kwi. 2003, doi: 10.1128/JVI.77.8.4888-4898.2003.
- [101] N. Nozawa *i in.*, „Identification and characterization of the UL7 gene product of herpes simplex virus type 2”, *Virus Genes*, t. 24, nr 3, s. 257–266, cze. 2002, doi: 10.1023/a:1015332716927.
- [102] W. Fuchs, H. Granzow, R. Klopffleisch, B. G. Klupp, D. Rosenkranz, i T. C. Mettenleiter, „The UL7 Gene of Pseudorabies Virus Encodes a Nonessential Structural Protein Which Is Involved in Virion Formation and Egress”, *J. Virol.*, t. 79, nr 17, s. 11291–11299, wrz. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.17.11291-11299.2005.
- [103] B. G. Klupp *i in.*, „Functional analysis of the pseudorabies virus UL51 protein”, *J. Virol.*, t. 79, nr 6, s. 3831–3840, mar. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.6.3831-3840.2005.
- [104] N. Nozawa *i in.*, „Herpes Simplex Virus Type 1 UL51 Protein Is Involved in Maturation and Egress of Virus Particles”, *J. Virol.*, t. 79, nr 11, s. 6947–6956, cze. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.11.6947-6956.2005.
- [105] S. Oda, J. Aii, N. Koyanagi, A. Kato, i Y. Kawaguchi, „The Interaction between Herpes Simplex Virus 1 Tegument Proteins UL51 and UL14 and Its Role in Virion Morphogenesis”, *J. Virol.*, t. 90, nr 19, s. 8754–8767, paź. 2016, doi: 10.1128/JVI.01258-16.
- [106] A. Albecka *i in.*, „Dual Function of the pUL7-pUL51 Tegument Protein Complex in Herpes Simplex Virus 1 Infection”, *J. Virol.*, t. 91, nr 2, s. e02196-16, sty. 2017, doi: 10.1128/JVI.02196-16.

- [107] J. S. Loomis, J. B. Bowzard, R. J. Courtney, i J. W. Wills, „Intracellular Trafficking of the UL11 Tegument Protein of Herpes Simplex Virus Type 1”, *J. Virol.*, t. 75, nr 24, s. 12209–12219, grudz. 2001, doi: 10.1128/JVI.75.24.12209-12219.2001.
- [108] C. A. MacLean, B. Clark, i D. J. Y. 1989 McGeoch, „Gene UL11 of Herpes Simplex Virus Type 1 Encodes a Virion Protein which Is Myristylated”, *J. Gen. Virol.*, t. 70, nr 12, s. 3147–3157, doi: 10.1099/0022-1317-70-12-3147.
- [109] N. Nozawa, T. Daikoku, T. Koshizuka, Y. Yamauchi, T. Yoshikawa, i Y. Nishiyama, „Subcellular Localization of Herpes Simplex Virus Type 1 UL51 Protein and Role of Palmitoylation in Golgi Apparatus Targeting”, *J. Virol.*, t. 77, nr 5, s. 3204–3216, mar. 2003, doi: 10.1128/JVI.77.5.3204-3216.2003.
- [110] J. Han, P. Chadha, D. G. Meckes, N. L. Baird, i J. W. Wills, „Interaction and Interdependent Packaging of Tegument Protein UL11 and Glycoprotein E of Herpes Simplex Virus  $\nu$ ”, *J. Virol.*, t. 85, nr 18, s. 9437–9446, wrz. 2011, doi: 10.1128/JVI.05207-11.
- [111] J. Han, P. Chadha, J. L. Starkey, i J. W. Wills, „Function of glycoprotein E of herpes simplex virus requires coordinated assembly of three tegument proteins on its cytoplasmic tail”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 109, nr 48, s. 19798–19803, lis. 2012, doi: 10.1073/pnas.1212900109.
- [112] R. J. Roller, A. C. Haugo, K. Yang, i J. D. Baines, „The Herpes Simplex Virus 1 UL51 Gene Product Has Cell Type-Specific Functions in Cell-to-Cell Spread”, *J. Virol.*, t. 88, nr 8, s. 4058–4068, kwi. 2014, doi: 10.1128/JVI.03707-13.
- [113] J. D. Pitts, J. Klabis, A. L. Richards, G. A. Smith, i E. E. Heldwein, „Crystal structure of the herpesvirus inner tegument protein UL37 supports its essential role in control of viral trafficking”, *J. Virol.*, t. 88, nr 10, s. 5462–5473, maj 2014, doi: 10.1128/JVI.00163-14.
- [114] N. Jambunathan *i in.*, „Herpes Simplex Virus 1 Protein UL37 Interacts with Viral Glycoprotein gK and Membrane Protein UL20 and Functions in Cytoplasmic Virion Envelopment”, *J. Virol.*, t. 88, nr 11, s. 5927–5935, cze. 2014, doi: 10.1128/JVI.00278-14.
- [115] P. G. Spear, „Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. I. Identification of four glycoprotein precursors and their products in type 1-infected cells.”, *J. Virol.*, t. 17, nr 3, s. 991–1008, mar. 1976, Dostęp: 24 sierpień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC515499/>
- [116] B. Norrild, I. Virtanen, B. Pedersen, i L. Pereira, „Requirements for transport of HSV-1 glycoproteins to the cell surface membrane of human fibroblasts and Vero cells”, *Arch. Virol.*, t. 77, nr 2–4, s. 155–166, 1983, doi: 10.1007/BF01309264.
- [117] D. Henaff, K. Radtke, i R. Lippé, „Herpesviruses exploit several host compartments for envelopment”, *Traffic Cph. Den.*, t. 13, nr 11, s. 1443–1449, lis. 2012, doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01399.x.
- [118] M. Hollinshead, H. L. Johns, C. L. Sayers, C. Gonzalez-Lopez, G. L. Smith, i G. Elliott, „Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus”, *EMBO J.*, t. 31, nr 21, s. 4204–4220, lis. 2012, doi: 10.1038/emboj.2012.262.
- [119] C. M. Crump, C. Yates, i T. Minson, „Herpes Simplex Virus Type 1 Cytoplasmic Envelopment Requires Functional Vps4”, *J. Virol.*, t. 81, nr 14, s. 7380–7387, lip. 2007, doi: 10.1128/JVI.00222-07.
- [120] T. Pawliczek i C. M. Crump, „Herpes Simplex Virus Type 1 Production Requires a Functional ESCRT-III Complex but Is Independent of TSG101 and ALIX Expression”, *J. Virol.*, t. 83, nr 21, s. 11254–11264, lis. 2009, doi: 10.1128/JVI.00574-09.
- [121] H. Kharkwal, C. G. Smith, i D. W. Wilson, „Herpes Simplex Virus Capsid Localization to ESCRT-VPS4 Complexes in the Presence and Absence of the Large Tegument Protein UL36p”, *J. Virol.*, t. 90, nr 16, s. 7257–7267, sie. 2016, doi: 10.1128/JVI.00857-16.
- [122] S. V. Zaichick, K. P. Bohannon, A. Hughes, P. J. Sollars, G. E. Pickard, i G. A. Smith, „The herpesvirus VP1/2 protein is an effector of dynein-mediated capsid transport and neuroinvasion”, *Cell Host Microbe*, t. 13, nr 2, s. 193–203, luty 2013, doi: 10.1016/j.chom.2013.01.009.
- [123] R. G. Jarman, E. K. Wagner, i D. C. Bloom, „LAT Expression during an Acute HSV Infection in the Mouse”, *Virology*, t. 262, nr 2, s. 384–397, wrz. 1999, doi: 10.1006/viro.1999.9861.

- [124] C. Jones, „Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency”, *Clin. Microbiol. Rev.*, t. 16, nr 1, s. 79–95, sty. 2003, doi: 10.1128/CMR.16.1.79-95.2003.
- [125] P. G. E. Kennedy, J. Rovnak, H. Badani, i R. J. Cohrs, „A comparison of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency and reactivation”, *J. Gen. Virol.*, t. 96, nr Pt 7, s. 1581–1602, lip. 2015, doi: 10.1099/vir.0.000128.
- [126] A. H. Batchelor, K. W. Wilcox, i P. O’Hare, „Binding and repression of the latency-associated promoter of herpes simplex virus by the immediate early 175K protein”, *J. Gen. Virol.*, t. 75 ( Pt 4), s. 753–767, kwi. 1994, doi: 10.1099/0022-1317-75-4-753.
- [127] M. J. Farrell, A. T. Dobson, i L. T. Feldman, „Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 88, nr 3, s. 790–794, luty 1991, Dostęp: 25 sierpień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC50899/>
- [128] R. Mukerjee, W. Kang, V. Suri, i N. W. Fraser, „A non-consensus branch point plays an important role in determining the stability of the 2-kb LAT intron during acute and latent infections of herpes simplex virus type-1”, *Virology*, t. 324, nr 2, s. 340–349, lip. 2004, doi: 10.1016/j.virol.2004.03.043.
- [129] D. Phelan, E. R. Barrozo, i D. C. Bloom, „HSV1 latent transcription and non-coding RNA: A critical retrospective”, *J. Neuroimmunol.*, t. 308, s. 65–101, lip. 2017, doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.03.002.
- [130] N. M. Sawtell i R. L. Thompson, „Alpha Herpesvirus Latency and Reactivation With a Focus on Herpes Simplex Virus”, w *Alphaherpesviruses: Molecular Biology, Host Interactions and Control*, Caister Academic Press, 2020. doi: 10.21775/9781913652555.06.
- [131] R. L. Thompson i N. M. Sawtell, „The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency”, *J. Virol.*, t. 71, nr 7, s. 5432–5440, lip. 1997, doi: 10.1128/JVI.71.7.5432-5440.1997.
- [132] R. L. Thompson i N. M. Sawtell, „Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival”, *J. Virol.*, t. 75, nr 14, s. 6660–6675, lip. 2001, doi: 10.1128/JVI.75.14.6660-6675.2001.
- [133] A. C. Wilson i I. Mohr, „A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons”, *Trends Microbiol.*, t. 20, nr 12, s. 604–611, grudz. 2012, doi: 10.1016/j.tim.2012.08.005.
- [134] B. Roizman i R. J. Whitley, „An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation”, *Annu. Rev. Microbiol.*, t. 67, s. 355–374, 2013, doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155654.
- [135] A. R. Cliffe i A. C. Wilson, „Restarting Lytic Gene Transcription at the Onset of Herpes Simplex Virus Reactivation”, *J. Virol.*, t. 91, nr 2, s. e01419-16, sty. 2017, doi: 10.1128/JVI.01419-16.
- [136] G. Smith, „Herpesvirus Transport to the Nervous System and Back Again”, *Annu. Rev. Microbiol.*, t. 66, nr 1, s. 153–176, 2012, doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150051.
- [137] L. Hu, S. E. Crawford, J. M. Hyser, M. K. Estes, i B. V. Prasad, „Rotavirus non-structural proteins: structure and function”, *Curr. Opin. Virol.*, t. 2, nr 4, s. 380–388, sie. 2012, doi: 10.1016/j.coviro.2012.06.003.
- [138] J. L. Nieva, V. Madan, i L. Carrasco, „Viroporins: structure and biological functions”, *Nat. Rev. Microbiol.*, t. 10, nr 8, s. 563–574, sie. 2012, doi: 10.1038/nrmicro2820.
- [139] K. M. Giorda i D. N. Hebert, „Viroporins Customize Host Cells for Efficient Viral Propagation”, *DNA Cell Biol.*, t. 32, nr 10, s. 557–564, paź. 2013, doi: 10.1089/dna.2013.2159.
- [140] M. Lorizate i H.-G. Kräusslich, „Role of Lipids in Virus Replication”, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, t. 3, nr 10, s. a004820, sty. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004820.
- [141] J. Votteler i W. I. Sundquist, „Virus Budding and the ESCRT Pathway”, *Cell Host Microbe*, t. 14, nr 3, s. 232–241, wrz. 2013, doi: 10.1016/j.chom.2013.08.012.
- [142] W. Weissenhorn, E. Poudevigne, G. Effantin, i P. Bassereau, „How to get out: ssRNA enveloped viruses and membrane fission”, *Curr. Opin. Virol.*, t. 3, nr 2, s. 159–167, kwi. 2013, doi: 10.1016/j.coviro.2013.03.011.
- [143] N. Cifuentes-Munoz, F. El Najjar, i R. E. Dutch, „Viral cell-to-cell spread: Conventional and non-conventional ways”, *Adv. Virus Res.*, t. 108, s. 85–125, 2020, doi: 10.1016/bs.aivir.2020.09.002.
- [144] Q. Sattentau, „Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses”, *Nat. Rev. Microbiol.*, t. 6, nr 11, s. 815–826, lis. 2008, doi: 10.1038/nrmicro1972.



- [145] D. S. Dimitrov, R. L. Willey, H. Sato, L. J. Chang, R. Blumenthal, i M. A. Martin, „Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics”, *J. Virol.*, t. 67, nr 4, s. 2182–2190, kwi. 1993, doi: 10.1128/jvi.67.4.2182-2190.1993.
- [146] J. L. Spouge, R. I. Shrager, i D. S. Dimitrov, „HIV-1 infection kinetics in tissue cultures”, *Math. Biosci.*, t. 138, nr 1, s. 1–22, lis. 1996, doi: 10.1016/S0025-5564(96)00064-8.
- [147] P. Chen, W. Hübner, M. A. Spinelli, i B. K. Chen, „Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses”, *J. Virol.*, t. 81, nr 22, s. 12582–12595, lis. 2007, doi: 10.1128/JVI.00381-07.
- [148] M. Sourisseau, N. Sol-Foulon, F. Porrot, F. Blanchet, i O. Schwartz, „Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes”, *J. Virol.*, t. 81, nr 2, s. 1000–1012, sty. 2007, doi: 10.1128/JVI.01629-06.
- [149] M. Boullé *i in.*, „HIV Cell-to-Cell Spread Results in Earlier Onset of Viral Gene Expression by Multiple Infections per Cell”, *PLOS Pathog.*, t. 12, nr 11, s. e1005964, lis. 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005964.
- [150] N. M. Sherer, M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Soto, C. Horensavitz, M. Pypaert, i W. Mothes, „Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission”, *Nat. Cell Biol.*, t. 9, nr 3, s. 310–315, mar. 2007, doi: 10.1038/ncb1544.
- [151] G. Vasiliver-Shamis, M. W. Cho, C. E. Hioe, i M. L. Dustin, „Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope gp120-Induced Partial T-Cell Receptor Signaling Creates an F-Actin-Depleted Zone in the Virological Synapse”, *J. Virol.*, t. 83, nr 21, s. 11341–11355, lis. 2009, doi: 10.1128/JVI.01440-09.
- [152] D. M. Lawrence, C. E. Patterson, T. L. Gales, J. L. D’Orazio, M. M. Vaughn, i G. F. Rall, „Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytium formation, or extracellular virus production”, *J. Virol.*, t. 74, nr 4, s. 1908–1918, luty 2000, doi: 10.1128/jvi.74.4.1908-1918.2000.
- [153] B. K. Singh *i in.*, „The Nectin-4/Afadin Protein Complex and Intercellular Membrane Pores Contribute to Rapid Spread of Measles Virus in Primary Human Airway Epithelia”, *J. Virol.*, t. 89, nr 14, s. 7089–7096, doi: 10.1128/JVI.00821-15.
- [154] B. K. Singh, N. Li, A. C. Mark, M. Mateo, R. Cattaneo, i P. L. Sinn, „Cell-to-Cell Contact and Nectin-4 Govern Spread of Measles Virus from Primary Human Myeloid Cells to Primary Human Airway Epithelial Cells”, *J. Virol.*, t. 90, nr 15, s. 6808–6817, lip. 2016, doi: 10.1128/JVI.00266-16.
- [155] K. S. Dingwell *i in.*, „Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells”, *J. Virol.*, t. 68, nr 2, s. 834–845, luty 1994, doi: 10.1128/JVI.68.2.834-845.1994.
- [156] Y. Iwasaki i H. F. Clark, „Cell to cell transmission of virus in the central nervous system. II. Experimental rabies in mouse”, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, t. 33, nr 4, s. 391–399, paź. 1975.
- [157] S. Sowinski *i in.*, „Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission”, *Nat. Cell Biol.*, t. 10, nr 2, s. 211–219, luty 2008, doi: 10.1038/ncb1682.
- [158] M. Law, R. Hollinshead, i G. L. Y. 2002 Smith, „Antibody-sensitive and antibody-resistant cell-to-cell spread by vaccinia virus: role of the A33R protein in antibody-resistant spread”, *J. Gen. Virol.*, t. 83, nr 1, s. 209–222, doi: 10.1099/0022-1317-83-1-209.
- [159] H. W. Favoreel, G. V. Minnebruggen, D. Adriaensen, i H. J. Nauwynck, „Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 102, nr 25, s. 8990–8995, cze. 2005, doi: 10.1073/pnas.0409099102.
- [160] H. W. Favoreel, G. Van Minnebruggen, G. R. Van de Walle, J. Ficinska, i H. J. Nauwynck, „Herpesvirus interference with virus-specific antibodies: bridging antibodies, internalizing antibodies, and hiding from antibodies”, *Vet. Microbiol.*, t. 113, nr 3–4, s. 257–263, mar. 2006, doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.003.

- [161] M. Krupovič, V. Cvirkaitė-Krupovič, i D. H. Bamford, „Protein A33 responsible for antibody-resistant spread of Vaccinia virus is homologous to C-type lectin-like proteins”, *Virus Res.*, t. 151, nr 1, s. 97–101, lip. 2010, doi: 10.1016/j.virusres.2010.03.004.
- [162] A.-M. Pais-Correia *i in.*, „Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses”, *Nat. Med.*, t. 16, nr 1, s. 83–89, sty. 2010, doi: 10.1038/nm.2065.
- [163] C. L. Brimacombe *i in.*, „Neutralizing Antibody-Resistant Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission”, *J. Virol.*, t. 85, nr 1, s. 596–605, sty. 2011, doi: 10.1128/JVI.01592-10.
- [164] O. Paloheimo *i in.*, „Coxsackievirus B3-Induced Cellular Protrusions: Structural Characteristics and Functional Competence”, *J. Virol.*, t. 85, nr 13, s. 6714–6724, lip. 2011, doi: 10.1128/JVI.00247-10.
- [165] M. G. Martinez i M. Kielian, „Intercellular Extensions Are Induced by the Alphavirus Structural Proteins and Mediate Virus Transmission”, *PLOS Pathog.*, t. 12, nr 12, s. e1006061, grudz. 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1006061.
- [166] F. E. Najjar *i in.*, „Human metapneumovirus Induces Reorganization of the Actin Cytoskeleton for Direct Cell-to-Cell Spread”, *PLOS Pathog.*, t. 12, nr 9, s. e1005922, wrz. 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005922.
- [167] R. Guo, B. B. Katz, J. M. Tomich, T. Gallagher, i Y. Fang, „Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Utilizes Nanotubes for Intercellular Spread”, *J. Virol.*, t. 90, nr 10, s. 5163–5175, kwi. 2016, doi: 10.1128/JVI.00036-16.
- [168] R. J. J. Jansens *i in.*, „Pseudorabies Virus US3-Induced Tunneling Nanotubes Contain Stabilized Microtubules, Interact with Neighboring Cells via Cadherins, and Allow Intercellular Molecular Communication”, *J. Virol.*, t. 91, nr 19, s. e00749-17, doi: 10.1128/JVI.00749-17.
- [169] A. Kumar *i in.*, „Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread”, *Sci. Rep.*, t. 7, s. 40360, sty. 2017, doi: 10.1038/srep40360.
- [170] A. Sarfo *i in.*, „The UL21 Tegument Protein of Herpes Simplex Virus 1 Is Differentially Required for the Syncytial Phenotype”, *J. Virol.*, t. 91, nr 21, s. e01161-17, doi: 10.1128/JVI.01161-17.
- [171] R. Guo, D. Davis, i Y. Fang, „Intercellular transfer of mitochondria rescues virus-induced cell death but facilitates cell-to-cell spreading of porcine reproductive and respiratory syndrome virus”, *Virology*, t. 517, s. 122–134, kwi. 2018, doi: 10.1016/j.virol.2017.12.018.
- [172] M. Panasiuk, M. Rychłowski, N. Derewońko, i K. Bieńkowska-Szewczyk, „Tunneling Nanotubes as a Novel Route of Cell-to-Cell Spread of Herpesviruses”, *J. Virol.*, t. 92, nr 10, s. e00090-18, kwi. 2018, doi: 10.1128/JVI.00090-18.
- [173] F. Wang, E. E. Zumbun, J. Huang, H. Si, L. Makaroun, i H. M. Friedman, „Herpes Simplex Virus Type 2 Glycoprotein E Is Required for Efficient Virus Spread from Epithelial Cells to Neurons and for Targeting Viral Proteins from the Neuron Cell Body into Axons”, *Virology*, t. 405, nr 2, s. 269–279, wrz. 2010, doi: 10.1016/j.virol.2010.06.006.
- [174] J. M. Timpe *i in.*, „Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies”, *Hepatology. Baltim. Md.*, t. 47, nr 1, s. 17–24, sty. 2008, doi: 10.1002/hep.21959.
- [175] J. Witteveldt *i in.*, „CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells”, *J. Gen. Virol.*, t. 90, nr 1, s. 48–58, doi: 10.1099/vir.0.006700-0.
- [176] M. B. Zeisel, J. Lupberger, I. Fofana, i T. F. Baumert, „Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C – Perspectives and challenges”, *J. Hepatol.*, t. 58, nr 2, s. 375–384, luty 2013, doi: 10.1016/j.jhep.2012.09.022.
- [177] F. Xiao *i in.*, „Hepatitis C Virus Cell-Cell Transmission and Resistance to Direct-Acting Antiviral Agents”, *PLOS Pathog.*, t. 10, nr 5, s. e1004128, maj 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004128.
- [178] C. T. Costiniuk i M.-A. 2014 Jenabian, „Cell-to-cell transfer of HIV infection: implications for HIV viral persistence”, *J. Gen. Virol.*, t. 95, nr 11, s. 2346–2355, doi: 10.1099/vir.0.069641-0.
- [179] A. Sigal *i in.*, „Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy”, *Nature*, t. 477, nr 7362, s. 95–98, sie. 2011, doi: 10.1038/nature10347.
- [180] C. J. A. Duncan, R. A. Russell, i Q. J. Sattentau, „High multiplicity HIV-1 cell-to-cell transmission from macrophages to CD4+ T cells limits antiretroviral efficacy”, *AIDS Lond. Engl.*, t. 27, nr 14, s. 2201–2206, wrz. 2013, doi: 10.1097/QAD.0b013e3283632ec4.

- [181] F. Cocchi, L. Menotti, P. Dubreuil, M. Lopez, i G. Campadelli-Fiume, „Cell-to-Cell Spread of Wild-Type Herpes Simplex Virus Type 1, but Not of Syncytial Strains, Is Mediated by the Immunoglobulin-Like Receptors That Mediate Virion Entry, Nectin1 (PRR1/HveC/HlgR) and Nectin2 (PRR2/HveB)”, *J. Virol.*, t. 74, nr 8, s. 3909–3917, kwi. 2000, Dostęp: 3 wrzesień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC111902/>
- [182] G. Gerna *i in.*, „Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cells via transient microfusion events”, *J. Virol.*, t. 74, nr 12, s. 5629–5638, cze. 2000, doi: 10.1128/jvi.74.12.5629-5638.2000.
- [183] N. L. Cole i C. Grose, „Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus”, *Rev. Med. Virol.*, t. 13, nr 4, s. 207–222, sie. 2003, doi: 10.1002/rmv.377.
- [184] I. Fugier-Vivier, C. Servet-Delprat, P. Rivaller, M.-C. Rissoan, Y.-J. Liu, i C. Roubardin-Combe, „Measles Virus Suppresses Cell-mediated Immunity by Interfering with the Survival and Functions of Dendritic and T Cells”, *J. Exp. Med.*, t. 186, nr 6, s. 813–823, wrz. 1997, Dostęp: 3 wrzesień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2199042/>
- [185] M. B. McChesney *i in.*, „Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host”, *Virology*, t. 233, nr 1, s. 74–84, cze. 1997, doi: 10.1006/viro.1997.8576.
- [186] K. Takeuchi, N. Miyajima, N. Nagata, M. Takeda, i M. Tashiro, „Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism”, *Virus Res.*, t. 94, nr 1, s. 11–16, lip. 2003, doi: 10.1016/s0168-1702(03)00117-5.
- [187] S. Fais, V. L. Burgio, M. R. Capobianchi, S. Gessani, F. Pallone, i F. Belardelli, „The biological relevance of polykaryons in the immune response”, *Immunol. Today*, t. 18, nr 11, s. 522–527, lis. 1997, doi: 10.1016/s0167-5699(97)01148-1.
- [188] R. Nardacci *i in.*, „Characterization of cell death pathways in human immunodeficiency virus-associated encephalitis”, *Am. J. Pathol.*, t. 167, nr 3, s. 695–704, wrz. 2005, doi: 10.1016/S0002-9440(10)62044-5.
- [189] D. C. Johnson i M. T. Huber, „Directed Egress of Animal Viruses Promotes Cell-to-Cell Spread”, *J. Virol.*, t. 76, nr 1, s. 1–8, sty. 2002, doi: 10.1128/JVI.76.1.1-8.2002.
- [190] D. C. Johnson i J. D. Baines, „Herpesviruses remodel host membranes for virus egress”, *Nat. Rev. Microbiol.*, t. 9, nr 5, s. 382–394, maj 2011, doi: 10.1038/nrmicro2559.
- [191] H. Fan, L. Qiao, K.-D. Kang, J. Fan, W. Wei, i G. Luo, „Attachment and Postattachment Receptors Important for Hepatitis C Virus Infection and Cell-to-Cell Transmission”, *J. Virol.*, t. 91, nr 13, s. e00280-17, doi: 10.1128/JVI.00280-17.
- [192] P. Lewis, Y. Fu, i T. L. Lentz, „Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures”, *Muscle Nerve*, t. 23, nr 5, s. 720–730, maj 2000, doi: 10.1002/(sici)1097-4598(200005)23:5<720::aid-mus9>3.0.co;2-5.
- [193] L. W. Enquist, M. J. Tomishima, S. Gross, i G. A. Smith, „Directional spread of an alpha-herpesvirus in the nervous system”, *Vet. Microbiol.*, t. 86, nr 1–2, s. 5–16, kwi. 2002, doi: 10.1016/s0378-1135(01)00486-2.
- [194] T. C. Mettenleiter, „Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread”, *Virus Res.*, t. 92, nr 2, s. 197–206, kwi. 2003, doi: 10.1016/s0168-1702(02)00352-0.
- [195] N. Makhortova, P. Askovich, C. E. Patterson, L. A. Gechman, N. P. Gerard, i G. F. Rall, „Neurokinin-1 enables measles virus trans-synaptic spread in neurons”, *Virology*, t. 362, nr 1, s. 235–244, maj 2007, doi: 10.1016/j.virol.2007.02.033.
- [196] S. La Boissière, A. Izeta, S. Malcomber, i P. O’Hare, „Compartmentalization of VP16 in Cells Infected with Recombinant Herpes Simplex Virus Expressing VP16-Green Fluorescent Protein Fusion Proteins”, *J. Virol.*, t. 78, nr 15, s. 8002–8014, sie. 2004, doi: 10.1128/JVI.78.15.8002-8014.2004.
- [197] A. Brzozowska, M. Rychłowski, A. D. Lipińska, i K. Bieńkowska-Szewczyk, „Point mutations in BHV-1 Us3 gene abolish its ability to induce cytoskeletal changes in various cell types”, *Vet. Microbiol.*, t. 143, nr 1, s. 8–13, cze. 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.008.

- [198] N. Jouvenet *i in.*, „African swine fever virus induces filopodia-like projections at the plasma membrane”, *Cell. Microbiol.*, t. 8, nr 11, s. 1803–1811, lis. 2006, doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00750.x.
- [199] M. Mehedi *i in.*, „Actin-Related Protein 2 (ARP2) and Virus-Induced Filopodia Facilitate Human Respiratory Syncytial Virus Spread”, *PLOS Pathog.*, t. 12, nr 12, s. e1006062, grudz. 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1006062.
- [200] M. Bouhaddou *i in.*, „The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection”, *Cell*, t. 182, nr 3, s. 685–712.e19, sie. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.06.034.
- [201] R. J. J. Jansens, A. Tishchenko, i H. W. Favoreel, „Bridging the Gap: Virus Long-Distance Spread via Tunneling Nanotubes”, *J. Virol.*, t. 94, nr 8, mar. 2020, doi: 10.1128/JVI.02120-19.
- [202] M. Xiao, N. Xu, C. Wang, D.-W. Pang, i Z.-L. Zhang, „Dynamic monitoring of membrane nanotubes formation induced by vaccinia virus on a high throughput microfluidic chip”, *Sci. Rep.*, t. 7, s. 44835, mar. 2017, doi: 10.1038/srep44835.
- [203] A. Pepe, S. Pietropaoli, M. Vos, G. Barba-Spaeth, i C. Zurzolo, „Tunneling nanotubes provide a novel route for SARS-CoV-2 spreading between permissive cells and to non-permissive neuronal cells”, lis. 2021. doi: 10.1101/2021.11.15.468633.
- [204] C. Jolly i Q. J. Sattentau, „Retroviral spread by induction of virological synapses”, *Traffic Cph. Den.*, t. 5, nr 9, s. 643–650, wrz. 2004, doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00209.x.
- [205] R. A. Alvarez, M. I. Barría, i B. K. Chen, „Unique Features of HIV-1 Spread through T Cell Virological Synapses”, *PLOS Pathog.*, t. 10, nr 12, s. e1004513, grudz. 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004513.
- [206] M. Dupont i Q. J. Sattentau, „Macrophage Cell-Cell Interactions Promoting HIV-1 Infection”, *Viruses*, t. 12, nr 5, Art. nr 5, maj 2020, doi: 10.3390/v12050492.
- [207] M. Aubert, M. Yoon, D. D. Sloan, P. G. Spear, i K. R. Jerome, „The Virological Synapse Facilitates Herpes Simplex Virus Entry into T Cells”, *J. Virol.*, t. 83, nr 12, s. 6171–6183, cze. 2009, doi: 10.1128/JVI.02163-08.
- [208] M.-I. Thoulouze i A. Alcover, „Can viruses form biofilms?”, *Trends Microbiol.*, t. 19, nr 6, s. 257–262, cze. 2011, doi: 10.1016/j.tim.2011.03.002.
- [209] S. M. Robinson *i in.*, „Coxsackievirus B Exits the Host Cell in Shed Microvesicles Displaying Autophagosomal Markers”, *PLOS Pathog.*, t. 10, nr 4, s. e1004045, kwi. 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004045.
- [210] S. W. Bird, N. D. Maynard, M. W. Covert, i K. Kirkegaard, „Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 111, nr 36, s. 13081–13086, wrz. 2014, doi: 10.1073/pnas.1401437111.
- [211] M. Santiana *i in.*, „Vesicle-cloaked virus clusters are optimal units for inter-organismal viral transmission.”, *Cell Host Microbe*, t. 24, nr 2, s. 208–220.e8, sie. 2018, doi: 10.1016/j.chom.2018.07.006.
- [212] Z. Feng *i in.*, „A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes”, *Nature*, t. 496, nr 7445, s. 367–371, kwi. 2013, doi: 10.1038/nature12029.
- [213] V. Ramakrishnaiah *i in.*, „Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 110, nr 32, s. 13109–13113, sie. 2013, doi: 10.1073/pnas.1221899110.
- [214] A. Turner, B. Bruun, T. Minson, i H. Browne, „Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system”, *J. Virol.*, t. 72, nr 1, s. 873–875, sty. 1998, doi: 10.1128/JVI.72.1.873-875.1998.
- [215] K. S. Dingwell i D. C. Johnson, „The Herpes Simplex Virus gE-gI Complex Facilitates Cell-to-Cell Spread and Binds to Components of Cell Junctions”, *J. Virol.*, t. 72, nr 11, s. 8933–8942, lis. 1998, Dostęp: 7 wrzesień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC110310/>
- [216] A. Farnsworth i D. C. Johnson, „Herpes Simplex Virus gE/gI Must Accumulate in the trans-Golgi Network at Early Times and Then Redistribute to Cell Junctions To Promote Cell-Cell Spread”, *J. Virol.*, t. 80, nr 7, s. 3167–3179, kwi. 2006, doi: 10.1128/JVI.80.7.3167-3179.2006.

- [217] P. W. Howard, C. C. Wright, T. Howard, i D. C. Johnson, „Herpes Simplex Virus gE/gI Extracellular Domains Promote Axonal Transport and Spread from Neurons to Epithelial Cells”, *J. Virol.*, t. 88, nr 19, s. 11178–11186, paź. 2014, doi: 10.1128/JVI.01627-14.
- [218] H. van Leeuwen, G. Elliott, i P. O’Hare, „Evidence of a role for nonmuscle myosin II in herpes simplex virus type 1 egress”, *J. Virol.*, t. 76, nr 7, s. 3471–3481, kwi. 2002, doi: 10.1128/jvi.76.7.3471-3481.2002.
- [219] L. Maresova, T. J. Pasieka, i C. Grose, „Varicella-zoster Virus gB and gE coexpression, but not gB or gE alone, leads to abundant fusion and syncytium formation equivalent to those from gH and gL coexpression”, *J. Virol.*, t. 75, nr 19, s. 9483–9492, paź. 2001, doi: 10.1128/JVI.75.19.9483-9492.2001.
- [220] J. I. Cohen i H. Nguyen, „Varicella-zoster virus glycoprotein I is essential for growth of virus in Vero cells”, *J. Virol.*, t. 71, nr 9, s. 6913–6920, wrz. 1997, doi: 10.1128/jvi.71.9.6913-6920.1997.
- [221] A. Baiker *i in.*, „Varicella-zoster virus infection of human neural cells in vivo”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 101, nr 29, s. 10792–10797, lip. 2004, doi: 10.1073/pnas.0404016101.
- [222] B. G. Klupp, R. Nixdorf, i T. C. Mettenleiter, „Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion”, *J. Virol.*, t. 74, nr 15, s. 6760–6768, sie. 2000, doi: 10.1128/jvi.74.15.6760-6768.2000.
- [223] R. S. Tirabassi i L. W. Enquist, „Role of Envelope Protein gE Endocytosis in the Pseudorabies Virus Life Cycle”, *J. Virol.*, t. 72, nr 6, s. 4571–4579, cze. 1998, Dostęp: 7 wrzesień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC109969/>
- [224] M. G. Lyman, B. Feierbach, D. Curanovic, M. Bisher, i L. W. Enquist, „Pseudorabies virus Us9 directs axonal sorting of viral capsids”, *J. Virol.*, t. 81, nr 20, s. 11363–11371, paź. 2007, doi: 10.1128/JVI.01281-07.
- [225] J. Tyborowska, K. Bieńkowska-Szewczyk, M. Rychłowski, J. T. Van Oirschot, i F. A. Rijsewijk, „The extracellular part of glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 is sufficient for complex formation with glycoprotein I but not for cell-to-cell spread”, *Arch. Virol.*, t. 145, nr 2, s. 333–351, 2000, doi: 10.1007/s007050050026.
- [226] K. Nakamichi, K. Ohara, D. Kuroki, i H. Otsuka, „Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for viral growth by cell-to-cell infection”, *Virus Res.*, t. 68, nr 2, s. 175–181, lip. 2000, doi: 10.1016/S0168-1702(00)00171-4.
- [227] H. Yezid, K. Pannhorst, H. Wei, i S. I. Chowdhury, „Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) envelope protein gE subcellular trafficking is contributed by two separate YXXL/Φ motifs within the cytoplasmic tail which together promote efficient virus cell-to-cell spread”, *Virology*, t. 548, s. 136–151, wrz. 2020, doi: 10.1016/j.virol.2020.05.009.
- [228] C. Jones i S. Chowdhury, „A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines”, *Anim. Health Res. Rev.*, t. 8, nr 2, s. 187–205, grudz. 2007, doi: 10.1017/S146625230700134X.
- [229] D. C. Johnson, M. Webb, T. W. Wisner, i C. Brunetti, „Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread”, *J. Virol.*, t. 75, nr 2, s. 821–833, sty. 2001, doi: 10.1128/JVI.75.2.821-833.2001.
- [230] G. Campadelli-Fiume *i in.*, „The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell”, *Rev. Med. Virol.*, t. 17, nr 5, s. 313–326, paź. 2007, doi: 10.1002/rmv.546.
- [231] A. Reske, G. Pollara, C. Krummenacher, B. M. Chain, i D. R. Katz, „Understanding HSV-1 entry glycoproteins”, *Rev. Med. Virol.*, t. 17, nr 3, s. 205–215, cze. 2007, doi: 10.1002/rmv.531.
- [232] A. E. Ambrosini i L. W. Enquist, „Cell-fusion events induced by α-herpesviruses”, <http://dx.doi.org/10.2217/fvl.14.100>, 20 luty 2015. <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fvl.14.100> (dostęp 7 wrzesień 2021).
- [233] A. Buch *i in.*, „Inner tegument proteins of Herpes Simplex Virus are sufficient for intracellular capsid motility in neurons but not for axonal targeting”, *PLOS Pathog.*, t. 13, nr 12, s. e1006813, grudz. 2017, doi: 10.1371/journal.ppat.1006813.
- [234] J. P. Card *i in.*, „Neurotropic properties of pseudorabies virus: uptake and transneuronal passage in the rat central nervous system”, *J. Neurosci.*, t. 10, nr 6, s. 1974–1994, cze. 1990, doi: 10.1523/JNEUROSCI.10-06-01974.1990.

- [235] S. Salinas, G. Schiavo, i E. J. Kremer, „A hitchhiker’s guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins”, *Nat. Rev. Microbiol.*, t. 8, nr 9, s. 645–655, wrz. 2010, doi: 10.1038/nrmicro2395.
- [236] D. J. Holland, M. Miranda-Saksena, R. A. Boadle, P. Armati, i A. L. Cunningham, „Anterograde Transport of Herpes Simplex Virus Proteins in Axons of Peripheral Human Fetal Neurons: an Immunoelectron Microscopy Study”, *J. Virol.*, t. 73, nr 10, s. 8503–8511, paź. 1999, doi: 10.1128/JVI.73.10.8503-8511.1999.
- [237] G. A. Smith, S. P. Gross, i L. W. Enquist, „Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 98, nr 6, s. 3466–3470, mar. 2001, doi: 10.1073/pnas.061029798.
- [238] A. D. Brideau, J. P. Card, i L. W. Enquist, „Role of pseudorabies virus Us9, a type II membrane protein, in infection of tissue culture cells and the rat nervous system”, *J. Virol.*, t. 74, nr 2, s. 834–845, sty. 2000, doi: 10.1128/jvi.74.2.834-845.2000.
- [239] P. J. Husak, T. Kuo, i L. W. Enquist, „Pseudorabies virus membrane proteins gI and gE facilitate anterograde spread of infection in projection-specific neurons in the rat”, *J. Virol.*, t. 74, nr 23, s. 10975–10983, grudz. 2000, doi: 10.1128/jvi.74.23.10975-10983.2000.
- [240] K. Polcicova, P. S. Biswas, K. Banerjee, T. W. Wisner, B. T. Rouse, i D. C. Johnson, „Herpes keratitis in the absence of anterograde transport of virus from sensory ganglia to the cornea”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 102, nr 32, s. 11462–11467, sie. 2005, doi: 10.1073/pnas.0503230102.
- [241] A. Snyder, K. Polcicova, i D. C. Johnson, „Herpes Simplex Virus gE/gI and US9 Proteins Promote Transport of both Capsids and Virion Glycoproteins in Neuronal Axons”, *J. Virol.*, t. 82, nr 21, s. 10613–10624, lis. 2008, doi: 10.1128/JVI.01241-08.
- [242] P. W. Howard, T. L. Howard, i D. C. Johnson, „Herpes simplex virus membrane proteins gE/gI and US9 act cooperatively to promote transport of capsids and glycoproteins from neuron cell bodies into initial axon segments”, *J. Virol.*, t. 87, nr 1, s. 403–414, sty. 2013, doi: 10.1128/JVI.02465-12.
- [243] R. Kratchmarov *i in.*, „Glycoproteins gE and gI Are Required for Efficient KIF1A-Dependent Anterograde Axonal Transport of Alphaherpesvirus Particles in Neurons”, *J. Virol.*, t. 87, nr 17, s. 9431–9440, wrz. 2013, doi: 10.1128/JVI.01317-13.
- [244] S. Awasthi i H. M. Friedman, „Molecular association of herpes simplex virus type 1 glycoprotein E with membrane protein Us9”, *Arch. Virol.*, t. 161, nr 11, s. 3203–3213, lis. 2016, doi: 10.1007/s00705-016-3028-z.
- [245] G. DuRaine, T. W. Wisner, P. Howard, M. Williams, i D. C. Johnson, „Herpes Simplex Virus gE/gI and US9 Promote both Envelopment and Sorting of Virus Particles in the Cytoplasm of Neurons, Two Processes That Precede Anterograde Transport in Axons”, *J. Virol.*, t. 91, nr 11, s. e00050-17, doi: 10.1128/JVI.00050-17.
- [246] M. M. Saksena *i in.*, „Herpes Simplex Virus Type 1 Accumulation, Envelopment, and Exit in Growth Cones and Varicosities in Mid-Distal Regions of Axons”, *J. Virol.*, t. 80, nr 7, s. 3592–3606, kwi. 2006, doi: 10.1128/JVI.80.7.3592-3606.2006.
- [247] N. De Regge *i in.*, „ $\alpha$ -Herpesvirus glycoprotein D interaction with sensory neurons triggers formation of varicosities that serve as virus exit sites”, *J. Cell Biol.*, t. 174, nr 2, s. 267–275, lip. 2006, doi: 10.1083/jcb.200510156.
- [248] M. J. Tomishima i L. W. Enquist, „In Vivo Egress of an Alphaherpesvirus from Axons”, *J. Virol.*, t. 76, nr 16, s. 8310–8317, sie. 2002, doi: 10.1128/JVI.76.16.8310-8317.2002.
- [249] R. Dixit, V. Tiwari, i D. Shukla, „Herpes simplex virus type 1 induces filopodia in differentiated P19 neural cells to facilitate viral spread”, *Neurosci. Lett.*, t. 440, nr 2, s. 113–118, sie. 2008, doi: 10.1016/j.neulet.2008.05.031.
- [250] P. K. Mattila i P. Lappalainen, „Filopodia: molecular architecture and cellular functions”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, t. 9, nr 6, s. 446–454, cze. 2008, doi: 10.1038/nrm2406.
- [251] J. Faix i K. Rottner, „The making of filopodia”, *Curr. Opin. Cell Biol.*, t. 18, nr 1, s. 18–25, luty 2006, doi: 10.1016/j.ceb.2005.11.002.
- [252] A. Rustom, R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, i H.-H. Gerdes, „Nanotubular highways for intercellular organelle transport”, *Science*, t. 303, nr 5660, s. 1007–1010, luty 2004, doi: 10.1126/science.1093133.

- [253] B. Önfelt *i in.*, „Structurally Distinct Membrane Nanotubes between Human Macrophages Support Long-Distance Vesicular Traffic or Surfing of Bacteria”, *J. Immunol.*, t. 177, nr 12, s. 8476–8483, grudz. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.12.8476.
- [254] S. Gurke, J. F. V. Barroso, E. Hodneland, N. V. Bukoreshtliev, O. Schlicker, i H.-H. Gerdes, „Tunneling nanotube (TNT)-like structures facilitate a constitutive, actomyosin-dependent exchange of endocytic organelles between normal rat kidney cells”, *Exp. Cell Res.*, t. 314, nr 20, s. 3669–3683, grudz. 2008, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.08.022.
- [255] K. Gousset, L. Marzo, P.-H. Commere, i C. Zurzolo, „Myo10 is a key regulator of TNT formation in neuronal cells”, *J. Cell Sci.*, t. 126, nr Pt 19, s. 4424–4435, paź. 2013, doi: 10.1242/jcs.129239.
- [256] S. P. Gross, „Hither and yon: a review of bi-directional microtubule-based transport”, *Phys. Biol.*, t. 1, nr 1–2, s. R1-11, cze. 2004, doi: 10.1088/1478-3967/1/2/R01.
- [257] E. A. Eugenin, P. J. Gaskill, i J. W. Berman, „Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: A potential mechanism for intercellular HIV trafficking”, *Cell. Immunol.*, t. 254, nr 2, s. 142–148, sty. 2009, doi: 10.1016/j.cellimm.2008.08.005.
- [258] B. Onfelt, S. Nedvetzki, K. Yanagi, i D. M. Davis, „Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, t. 173, nr 3, s. 1511–1513, sie. 2004, doi: 10.4049/jimmunol.173.3.1511.
- [259] H. R. Chinnery, E. Pearlman, i P. G. McMenemy, „Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, t. 180, nr 9, s. 5779–5783, maj 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5779.
- [260] Y. Wang, J. Cui, X. Sun, i Y. Zhang, „Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation”, *Cell Death Differ.*, t. 18, nr 4, s. 732–742, kwi. 2011, doi: 10.1038/cdd.2010.147.
- [261] E. Lou *i in.*, „Tunneling Nanotubes Provide a Unique Conduit for Intercellular Transfer of Cellular Contents in Human Malignant Pleural Mesothelioma”, *PLOS ONE*, t. 7, nr 3, s. e33093, mar. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033093.
- [262] X. Wang i H.-H. Gerdes, „Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells”, *Cell Death Differ.*, t. 22, nr 7, s. 1181–1191, lip. 2015, doi: 10.1038/cdd.2014.211.
- [263] C. Van den Broeke *i in.*, „Alphaherpesvirus US3-mediated reorganization of the actin cytoskeleton is mediated by group A p21-activated kinases”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 106, nr 21, s. 8707–8712, maj 2009, doi: 10.1073/pnas.0900436106.
- [264] R. L. Finnen, B. B. Roy, H. Zhang, i B. W. Banfield, „Analysis of filamentous process induction and nuclear localization properties of the HSV-2 serine/threonine kinase Us3”, *Virology*, t. 397, nr 1, s. 23–33, luty 2010, doi: 10.1016/j.virol.2009.11.012.
- [265] M. F. Ladelfa *i in.*, „Effect of the US3 protein of bovine herpesvirus 5 on the actin cytoskeleton and apoptosis”, *Vet. Microbiol.*, t. 153, nr 3–4, s. 361–366, grudz. 2011, doi: 10.1016/j.vetmic.2011.05.037.
- [266] T. Jacob, C. Van den Broeke, M. van Troys, D. Waterschoot, C. Ampe, i H. W. Favoreel, „Alphaherpesviral US3 kinase induces cofilin dephosphorylation to reorganize the actin cytoskeleton”, *J. Virol.*, t. 87, nr 7, s. 4121–4126, kwi. 2013, doi: 10.1128/JVI.03107-12.
- [267] T. Jacob, C. V. den Broeke, C. V. Waesberghe, L. V. Troys, i H. W. Favoreel, „Pseudorabies virus US3 triggers RhoA phosphorylation to reorganize the actin cytoskeleton”, *J. Gen. Virol.*, t. 96, nr 8, s. 2328–2335, sie. 2015, doi: 10.1099/vir.0.000152.
- [268] C. Jolly, K. Kashefi, M. Hollinshead, i Q. J. Sattentau, „HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse”, *J. Exp. Med.*, t. 199, nr 2, s. 283–293, sty. 2004, doi: 10.1084/jem.20030648.
- [269] V. Piguet i Q. Sattentau, „Dangerous liaisons at the virological synapse”, *J. Clin. Invest.*, t. 114, nr 5, s. 605–610, wrz. 2004, doi: 10.1172/JCI200422812.
- [270] L. Turin, S. Russo, i G. Poli, „BHV-1: New Molecular Approaches to Control a Common and Widespread Infection”, *Mol. Med.*, t. 5, nr 5, Art. nr 5, maj 1999, doi: 10.1007/BF03402063.
- [271] G. D. Mechor, C. G. Rousseaux, O. M. Radostits, L. A. Babiuk, i L. Petrie, „Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows”, *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire*, t. 51, nr 4, s. 452–459, paź. 1987.

- [272] B. Muylkens, J. Thiry, P. Kirten, F. Schynts, i E. Thiry, „Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis”, *Vet. Res.*, t. 38, nr 2, s. 181–209, kwi. 2007, doi: 10.1051/vetres:2006059.
- [273] R. J. Higgins i S. Edwards, „Systemic neonatal infectious bovine rhinotracheitis virus infection in suckler calves”, *Vet. Rec.*, t. 119, nr 8, s. 177–178, sie. 1986, doi: 10.1136/vr.119.8.177.
- [274] L. A. Bryan, R. A. Fenton, V. Misra, i D. M. Haines, „Fatal, generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves.”, *Can. Vet. J.*, t. 35, nr 4, s. 223–228, kwi. 1994.
- [275] M. J. Kaashoek, P. H. Straver, E. M. Van Rooij, J. Quak, i J. T. Van Oirschot, „Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects”, *Vet. Rec.*, t. 139, nr 17, s. 416–421, paź. 1996, doi: 10.1136/vr.139.17.416.
- [276] F. Boelaert *i in.*, „Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity”, *Prev. Vet. Med.*, t. 69, nr 3–4, s. 285–295, lip. 2005, doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.02.010.
- [277] J. J. Solis-Calderon, V. M. Segura-Correa, J. C. Segura-Correa, i A. Alvarado-Islas, „Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico”, *Prev. Vet. Med.*, t. 57, nr 4, s. 199–208, kwi. 2003, doi: 10.1016/S0167-5877(02)00230-1.
- [278] A. Vonk Noordegraaf, A. Labrovic, K. Frankena, D. U. Pfeiffer, i M. Nielen, „Simulated hazards of loosing infection-free status in a Dutch BHV1 model”, *Prev. Vet. Med.*, t. 62, nr 1, s. 51–58, sty. 2004, doi: 10.1016/j.prevetmed.2003.09.001.
- [279] M. Lemaire *i in.*, „Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 38, nr 5, s. 1885–1894, maj 2000.
- [280] E. Thiry, J. Saliki, M. Bublot, i P.-P. Pastoret, „Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport”, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, t. 10, nr 1, s. 59–63, sty. 1987, doi: 10.1016/0147-9571(87)90041-5.
- [281] E. Thiry, J. Saliki, A. Schwers, i P. P. Pastoret, „Parturition as a stimulus of IBR virus reactivation.”, *Vet. Rec.*, t. 116, nr 22, s. 599–600, cze. 1985, doi: 10.1136/vr.116.22.599.
- [282] A. E. Metzler, H. Matile, U. Gassmann, M. Engels, i R. Wyler, „European isolates of bovine herpesvirus 1: A comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies”, *Arch. Virol.*, t. 85, nr 1, s. 57–69, mar. 1985, doi: 10.1007/BF01317006.
- [283] M. Engels, F. Steck, i R. Wyler, „Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis”, *Arch. Virol.*, t. 67, nr 2, s. 169–174, cze. 1981, doi: 10.1007/BF01318601.
- [284] F. R. Spilki *i in.*, „Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a)”, *Pesqui. Veterinária Bras.*, t. 24, s. 43–49, 2004.
- [285] S. Edwards, R. Newman, i H. White, „The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype”, *Br. Vet. J.*, t. 147, nr 3, s. 216–231, 1991, doi: 10.1016/0007-1935(91)90046-p.
- [286] V. Smith, W. Coakley, i D. Maker, „Transmission of a genital isolate of bovine herpesvirus 1 to calves by the respiratory route”, *Aust. Vet. J.*, t. 56, nr 6, s. 302–304, cze. 1980, doi: 10.1111/j.1751-0813.1980.tb05731.x.
- [287] J. Miller, C. Whetstone, i M. Van der Maaten, „Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA”, *Am. J. Vet. Res.*, t. 52, nr 3, s. 458–461, mar. 1991.
- [288] S. Edwards, H. White, i P. Nixon, „A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K.”, *Vet. Microbiol.*, t. 22, nr 2, s. 213–223, kwi. 1990, doi: 10.1016/0378-1135(90)90108-8.
- [289] G. A. Smith, P. L. Young, i K. C. Reed, „Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots”, *Arch. Virol.*, t. 140, nr 3, s. 599–603, mar. 1995, doi: 10.1007/BF01718435.
- [290] C. A. Whetstone i J. M. Miller, „Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1”, *Arch. Virol.*, t. 107, nr 1, s. 27–34, mar. 1989, doi: 10.1007/BF01313875.



- [291] 2004/558/WE: Decyzja Komisji z dnia 15 lipca 2004 r. wdrażająca dyrektywę Rady nr 64/432/EWG w sprawie dodatkowych gwarancji dla handlu wewnątrzwspólnotowego bydłem odnoszących się do zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy bydła i zatwierdzenia programów zwalczania przedstawionych przez Państwa Członkowskie (notyfikowana jako dokument nr K(2004) 2104)(Tekst mający znaczenie dla EOG), t. 249. 2005. Dostęp: 16 październik 2020. [Online]. Dostępne na: <http://data.europa.eu/eli/dec/2004/558/oj/pol>
- [292] K. Raaperi, T. Orro, i A. Viltrop, „Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe”, *Vet. J.*, t. 201, nr 3, s. 249–256, wrz. 2014, doi: 10.1016/j.tvjl.2014.05.040.
- [293] J. C. Bosch, M. J. Kaashoek, i J. T. van Oirschot, „Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine”, *Vaccine*, t. 15, nr 14, s. 1512–1517, paź. 1997, doi: 10.1016/S0264-410X(97)00092-3.
- [294] P. Kerkhofs, X. Renjifo, J.-F. Toussaint, C. Letellier, E. Vanopdenbosch, i G. Wellemans, „Enhancement of the immune response and virological protection of calves against bovine herpesvirus type 1 with an inactivated gE-deleted vaccine”, *Vet. Rec.*, t. 152, nr 22, s. 681–686, maj 2003, doi: 10.1136/vr.152.22.681.
- [295] S. Petrini *i in.*, „Evaluation of Passive Immunity Induced by Immunisation Using Two Inactivated gE-deleted Marker Vaccines against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) in Calves”, *Vaccines*, t. 8, nr 1, sty. 2020, doi: 10.3390/vaccines8010014.
- [296] C. Jones i S. Chowdhury, „A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines”, *Anim. Health Res. Rev.*, t. 8, nr 2, Art. nr 2, grudz. 2007, doi: 10.1017/S146625230700134X.
- [297] C. Jones i S. Chowdhury, „Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is an important cofactor in the bovine respiratory disease complex”, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, t. 26, nr 2, s. 303–321, lip. 2010, doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.007.
- [298] D. Griffin, „Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle”, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, t. 13, nr 3, s. 367–377, lis. 1997, doi: 10.1016/s0749-0720(15)30302-9.
- [299] B. P. Cuddington i K. L. Mossman, „Oncolytic bovine herpesvirus type 1 as a broad spectrum cancer therapeutic”, *Curr. Opin. Virol.*, t. 13, s. 11–16, sie. 2015, doi: 10.1016/j.coviro.2015.03.010.
- [300] J. Pol *i in.*, „Trial Watch”, *Oncolimmunology*, t. 3, nr 4, s. e28185, kwi. 2014, doi: 10.4161/onci.28185.
- [301] R. Rodrigues, B. Cuddington, i K. Mossman, „Bovine herpesvirus type 1 as a novel oncolytic virus”, *Cancer Gene Ther.*, t. 17, nr 5, s. 344–355, maj 2010, doi: 10.1038/cgt.2009.77.
- [302] B. P. Cuddington i K. L. Mossman, „Permissiveness of Human Cancer Cells to Oncolytic Bovine Herpesvirus 1 Is Mediated in Part by KRAS Activity”, *J. Virol.*, t. 88, nr 12, s. 6885–6895, cze. 2014, doi: 10.1128/JVI.00849-14.
- [303] G. Campadelli-Fiume, F. Cocchi, L. Menotti, i M. Lopez, „The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells”, *Rev. Med. Virol.*, t. 10, nr 5, s. 305–319, paź. 2000, doi: 10.1002/1099-1654(200009/10)10:5<305::aid-rmv286>3.0.co;2-t.
- [304] Y. Sun *i in.*, „Combined evaluation of the expression status of CD155 and TIGIT plays an important role in the prognosis of LUAD (lung adenocarcinoma)”, *Int. Immunopharmacol.*, t. 80, s. 106198, mar. 2020, doi: 10.1016/j.intimp.2020.106198.
- [305] W. Qiu, X. Ding, S. Li, Y. He, i L. Zhu, „Oncolytic Bovine Herpesvirus 1 Inhibits Human Lung Adenocarcinoma A549 Cell Proliferation and Tumor Growth by Inducing DNA Damage”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 22, nr 16, s. 8582, sie. 2021, doi: 10.3390/ijms22168582.
- [306] J. Thiry *i in.*, „Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1”, *Vet. Res.*, t. 37, nr 2, s. 169–190, kwi. 2006, doi: 10.1051/vetres:2005052.
- [307] M. Schwyzer i M. Ackermann, „Molecular virology of ruminant herpesviruses”, *Vet. Microbiol.*, t. 53, nr 1, s. 17–29, lis. 1996, doi: 10.1016/S0378-1135(96)01231-X.
- [308] V. A. Jefferson, K. A. Barber, F. S. El-mayet, C. Jones, B. Nanduri, i F. Meyer, „Proteogenomic Identification of a Novel Protein-Encoding Gene in Bovine Herpesvirus 1 That Is Expressed during Productive Infection”, *Viruses*, t. 10, nr 9, s. 499, wrz. 2018, doi: 10.3390/v10090499.

- [309] X. Liang, B. Chow, C. Raggo, i L. A. Babiuk, „Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein.”, *J. Virol.*, t. 70, nr 3, s. 1448–1454, mar. 1996, Dostęp: 10 styczeń 2023. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC189965/>
- [310] J. F. Moffat, L. Zerboni, P. R. Kinchington, C. Grose, H. Kaneshima, i A. M. Arvin, „Attenuation of the vaccine Oka strain of varicella-zoster virus and role of glycoprotein C in alphaherpesvirus virulence demonstrated in the SCID-hu mouse”, *J. Virol.*, t. 72, nr 2, s. 965–974, luty 1998, doi: 10.1128/JVI.72.2.965-974.1998.
- [311] M. J. Kaashoek, P. H. Straver, E. M. Van Rooij, J. Quak, i J. T. Van Oirschot, „Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects”, *Vet. Rec.*, t. 139, nr 17, Art. nr 17, paź. 1996, doi: 10.1136/vr.139.17.416.
- [312] M. S. Warner *i in.*, „A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus”, *Virology*, t. 246, nr 1, s. 179–189, cze. 1998, doi: 10.1006/viro.1998.9218.
- [313] R. S. B. Milne, S. A. Connolly, C. Krummenacher, R. J. Eisenberg, i G. H. Cohen, „Porcine HveC, a Member of the Highly Conserved HveC/Nectin 1 Family, Is a Functional Alphaherpesvirus Receptor”, *Virology*, t. 281, nr 2, s. 315–328, mar. 2001, doi: 10.1006/viro.2000.0798.
- [314] E. Ono *i in.*, „Transgenic mice expressing a soluble form of porcine nectin-1/herpesvirus entry mediator C as a model for pseudorabies-resistant livestock”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 101, nr 46, s. 16150–16155, lis. 2004, doi: 10.1073/pnas.0405816101.
- [315] S. A. Connolly *i in.*, „Glycoprotein D homologs in herpes simplex virus type 1, pseudorabies virus, and bovine herpes virus type 1 bind directly to human HveC (nectin-1) with different affinities”, *Virology*, t. 280, nr 1, s. 7–18, luty 2001, doi: 10.1006/viro.2000.0747.
- [316] A. Carfi *i in.*, „Herpes simplex virus glycoprotein D bound to the human receptor HveA”, *Mol. Cell*, t. 8, nr 1, s. 169–179, lip. 2001, doi: 10.1016/s1097-2765(01)00298-2.
- [317] D. Shukla *i in.*, „A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry”, *Cell*, t. 99, nr 1, s. 13–22, paź. 1999, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80058-6.
- [318] V. Tiwari, C. O’Donnell, R. J. Copeland, T. Scarlett, J. Liu, i D. 2007 Shukla, „Soluble 3-O-sulfated heparan sulfate can trigger herpes simplex virus type 1 entry into resistant Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells”, *J. Gen. Virol.*, t. 88, nr 4, s. 1075–1079, doi: 10.1099/vir.0.82476-0.
- [319] G.-C. Perng i C. Jones, „Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle”, *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, t. 2010, s. 262415, 2010, doi: 10.1155/2010/262415.
- [320] C. Jones, „Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1) and Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Promote Survival of Latently Infected Sensory Neurons, in Part by Inhibiting Apoptosis”, *J. Cell Death*, t. 6, s. JCD.S10803, sty. 2013, doi: 10.4137/JCD.S10803.
- [321] W. Shen i C. Jones, „Open Reading Frame 2, Encoded by the Latency-Related Gene of Bovine Herpesvirus 1, Has Antiapoptotic Activity in Transiently Transfected Neuroblastoma Cells”, *J. Virol.*, t. 82, nr 21, s. 10940–10945, lis. 2008, doi: 10.1128/JVI.01289-08.
- [322] C. Jones, „Reactivation from latency by alpha-herpesvirinae subfamily members: a stressful stimulation”, *Curr Top Virol*, t. 12, s. 99–118, sty. 2014.
- [323] J. C. Whitbeck, A. C. Knapp, L. W. Enquist, W. C. Lawrence, i L. J. Bello, „Synthesis, processing, and oligomerization of bovine herpesvirus 1 gE and gI membrane proteins”, *J. Virol.*, t. 70, nr 11, s. 7878–7884, lis. 1996, doi: 10.1128/jvi.70.11.7878-7884.1996.
- [324] M. Rychłowski, *Struktura i funkcja domeny cytoplazmatycznej glikoproteiny gE bydłęcego herpeswirusa 1 (BHV1)*, Rozprawa doktorska. Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 2006.
- [325] R. S. Tirabassi, R. A. Townley, M. G. Eldridge, i L. W. Enquist, „Characterization of pseudorabies virus mutants expressing carboxy-terminal truncations of gE: evidence for envelope incorporation, virulence, and neurotropism domains”, *J. Virol.*, t. 71, nr 9, s. 6455–6464, wrz. 1997, doi: 10.1128/jvi.71.9.6455-6464.1997.

- [326] S. I. Chowdhury, C. S. Ross, B. J. Lee, V. Hall, i H. J. Chu, „Construction and characterization of a glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus type 1 recombinant”, *Am. J. Vet. Res.*, t. 60, nr 2, s. 227–232, luty 1999.
- [327] M. C. S. Brum, C. Coats, R. B. Sangena, A. Doster, C. Jones, i S. I. Chowdhury, „Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) anterograde neuronal transport from trigeminal ganglia to nose and eye requires glycoprotein E”, *J. Neurovirol.*, t. 15, nr 2, s. 196–201, mar. 2009, doi: 10.1080/13550280802549605.
- [328] R. S. Tirabassi i L. W. Enquist, „Role of the Pseudorabies Virus gI Cytoplasmic Domain in Neuroinvasion, Virulence, and Posttranslational N-Linked Glycosylation”, *J. Virol.*, t. 74, nr 8, s. 3505–3516, kwi. 2000, doi: 10.1128/JVI.74.8.3505-3516.2000.
- [329] Z. F. Liu, M. C. S. Brum, A. Doster, C. Jones, i S. I. Chowdhury, „A bovine herpesvirus type 1 mutant virus specifying a carboxyl-terminal truncation of glycoprotein E is defective in anterograde neuronal transport in rabbits and calves”, *J. Virol.*, t. 82, nr 15, s. 7432–7442, sie. 2008, doi: 10.1128/JVI.00379-08.
- [330] S. I. Chowdhury, J. Coats, R. A. Neis, S. M. Navarro, D. B. Paulsen, i J.-M. Feng, „A bovine herpesvirus type 1 mutant virus with truncated glycoprotein E cytoplasmic tail has defective anterograde neuronal transport in rabbit dorsal root ganglia primary neuronal cultures in a microfluidic chamber system”, *J. Neurovirol.*, t. 16, nr 6, s. 457–465, grudz. 2010, doi: 10.3109/13550284.2010.530639.
- [331] D. J. McGeoch, A. Dolan, S. Donald, i F. J. Rixon, „Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1”, *J. Mol. Biol.*, t. 181, nr 1, s. 1–13, sty. 1985, doi: 10.1016/0022-2836(85)90320-1.
- [332] J. K. Olson i C. Grose, „Endocytosis and recycling of varicella-zoster virus Fc receptor glycoprotein gE: internalization mediated by a YXXL motif in the cytoplasmic tail”, *J. Virol.*, t. 71, nr 5, s. 4042–4054, maj 1997, doi: 10.1128/jvi.71.5.4042-4054.1997.
- [333] R. S. Tirabassi i L. W. Enquist, „Mutation of the YXXL Endocytosis Motif in the Cytoplasmic Tail of Pseudorabies Virus gE”, *J. Virol.*, t. 73, nr 4, s. 2717–2728, kwi. 1999, doi: 10.1128/JVI.73.4.2717-2728.1999.
- [334] A. R. Brack, B. G. Klupp, H. Granzow, R. Tirabassi, L. W. Enquist, i T. C. Mettenleiter, „Role of the Cytoplasmic Tail of Pseudorabies Virus Glycoprotein E in Virion Formation”, *J. Virol.*, t. 74, nr 9, s. 4004–4016, maj 2000, doi: 10.1128/JVI.74.9.4004-4016.2000.
- [335] K. Polcicova, K. Goldsmith, B. L. Rainish, T. W. Wisner, i D. C. Johnson, „The Extracellular Domain of Herpes Simplex Virus gE Is Indispensable for Efficient Cell-to-Cell Spread: Evidence for gE/gI Receptors”, *J. Virol.*, t. 79, nr 18, s. 11990–12001, wrz. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.18.11990-12001.2005.
- [336] W. J. Collins i D. C. Johnson, „Herpes simplex virus gE/gI expressed in epithelial cells interferes with cell-to-cell spread”, *J. Virol.*, t. 77, nr 4, s. 2686–2695, luty 2003, doi: 10.1128/jvi.77.4.2686-2695.2003.
- [337] D. C. Johnson, R. L. Burke, i T. Gregory, „Soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D bind to a limited number of cell surface receptors and inhibit virus entry into cells.”, *J. Virol.*, t. 64, nr 6, s. 2569–2576, cze. 1990, Dostęp: 9 listopad 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC249433/>
- [338] Q. Li, M. A. Ali, i J. I. Cohen, „Insulin degrading enzyme is a cellular receptor mediating varicella-zoster virus infection and cell-to-cell spread”, *Cell*, t. 127, nr 2, s. 305–316, paź. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.08.046.
- [339] Q. Li, T. Krogmann, M. A. Ali, W.-J. Tang, i J. I. Cohen, „The Amino Terminus of Varicella-Zoster Virus (VZV) Glycoprotein E Is Required for Binding to Insulin-Degrading Enzyme, a VZV Receptor”, *J. Virol.*, t. 81, nr 16, s. 8525–8532, sie. 2007, doi: 10.1128/JVI.00286-07.
- [340] Q. Li *i in.*, „Insulin Degrading Enzyme Induces a Conformational Change in Varicella-Zoster Virus gE, and Enhances Virus Infectivity and Stability”, *PLOS ONE*, t. 5, nr 6, s. e11327, cze. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0011327.
- [341] M. Watanabe *i in.*, „Prohibitin-1 Contributes to Cell-to-Cell Transmission of Herpes Simplex Virus 1 via the MAPK/ERK Signaling Pathway”, *J. Virol.*, t. 95, nr 3, s. e01413-20, doi: 10.1128/JVI.01413-20.

- [342] M. J. Deruelle i H. W. Y. 2011 Favoreel, „Keep it in the subfamily: the conserved alphaherpesvirus US3 protein kinase”, *J. Gen. Virol.*, t. 92, nr 1, s. 18–30, doi: 10.1099/vir.0.025593-0.
- [343] A. P. W. Poon, H. Gu, i B. Roizman, „ICP0 and the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 independently block histone deacetylation to enable gene expression”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 103, nr 26, s. 9993–9998, cze. 2006, doi: 10.1073/pnas.0604142103.
- [344] M. S. Walters, A. Erazo, P. R. Kinchington, i S. Silverstein, „Histone Deacetylases 1 and 2 Are Phosphorylated at Novel Sites during Varicella-Zoster Virus Infection”, *J. Virol.*, t. 83, nr 22, s. 11502–11513, lis. 2009, doi: 10.1128/JVI.01318-09.
- [345] M. S. Walters, P. R. Kinchington, B. W. Banfield, i S. Silverstein, „Hyperphosphorylation of Histone Deacetylase 2 by Alphaherpesvirus US3 Kinases”, *J. Virol.*, t. 84, nr 19, s. 9666–9676, paź. 2010, doi: 10.1128/JVI.00981-10.
- [346] F. Wagenaar, J. M. A. Pol, B. Peeters, A. L. J. Gielkens, N. de Wind, i T. G. Y. 1995 Kimman, „The US3-encoded protein kinase from pseudorabies virus affects egress of virions from the nucleus”, *J. Gen. Virol.*, t. 76, nr 7, s. 1851–1859, doi: 10.1099/0022-1317-76-7-1851.
- [347] B. G. Klupp, H. Granzow, i T. C. Mettenleiter, „Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus”, *J. Gen. Virol.*, t. 82, nr Pt 10, s. 2363–2371, paź. 2001, doi: 10.1099/0022-1317-82-10-2363.
- [348] B. J. Ryckman i R. J. Roller, „Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship”, *J. Virol.*, t. 78, nr 1, s. 399–412, sty. 2004, doi: 10.1128/jvi.78.1.399-412.2004.
- [349] D. Schumacher, B. K. Tischer, S. Trapp, i N. Osterrieder, „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.*, t. 79, nr 7, s. 3987–3997, kwi. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.7.3987-3997.2005.
- [350] A. Kato, J. Arai, I. Shiratori, H. Akashi, H. Arase, i Y. Kawaguchi, „Herpes Simplex Virus 1 Protein Kinase Us3 Phosphorylates Viral Envelope Glycoprotein B and Regulates Its Expression on the Cell Surface”, *J. Virol.*, t. 83, nr 1, s. 250–261, sty. 2009, doi: 10.1128/JVI.01451-08.
- [351] A. Abendroth, I. Lin, B. Slobedman, H. Ploegh, i A. M. Arvin, „Varicella-zoster virus retains major histocompatibility complex class I proteins in the Golgi compartment of infected cells”, *J. Virol.*, t. 75, nr 10, s. 4878–4888, maj 2001, doi: 10.1128/JVI.75.10.4878-4888.2001.
- [352] D. D. Sloan, G. Zahariadis, C. M. Posavad, N. T. Pate, S. J. Kussick, i K. R. Jerome, „CTL are inactivated by herpes simplex virus-infected cells expressing a viral protein kinase”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, t. 171, nr 12, s. 6733–6741, grudz. 2003, doi: 10.4049/jimmunol.171.12.6733.
- [353] A. Piroozmand, A. H. Koyama, Y. Shimada, M. Fujita, T. Arakawa, i A. Adachi, „Role of Us3 gene of herpes simplex virus type 1 for resistance to interferon”, *Int. J. Mol. Med.*, t. 14, nr 4, s. 641–645, paź. 2004.
- [354] A. Schaap *i in.*, „T-Cell Tropism and the Role of ORF66 Protein in Pathogenesis of Varicella-Zoster Virus Infection”, *J. Virol.*, t. 79, nr 20, s. 12921–12933, paź. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.20.12921-12933.2005.
- [355] T. Murata, F. Goshima, T. Daikoku, H. Takakuwa, i Y. Nishiyama, „Expression of herpes simplex virus type 2 US3 affects the Cdc42/Rac pathway and attenuates c-Jun N-terminal kinase activation”, *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.*, t. 5, nr 12, s. 1017–1027, grudz. 2000, doi: 10.1046/j.1365-2443.2000.00383.x.
- [356] G. V. Minnebruggen, H. W. Favoreel, L. Jacobs, i H. J. Nauwynck, „Pseudorabies Virus US3 Protein Kinase Mediates Actin Stress Fiber Breakdown”, *J. Virol.*, t. 77, nr 16, s. 9074–9080, sie. 2003, doi: 10.1128/JVI.77.16.9074-9080.2003.
- [357] S. Asano *i in.*, „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.*, t. 80 ( Pt 1), s. 51–56, sty. 1999, doi: 10.1099/0022-1317-80-1-51.
- [358] S. Hata, A. H. Koyama, H. Shiota, A. Adachi, F. Goshima, i Y. Nishiyama, „Antiapoptotic activity of herpes simplex virus type 2: the role of US3 protein kinase gene”, *Microbes Infect.*, t. 1, nr 8, s. 601–607, lip. 1999, doi: 10.1016/s1286-4579(99)80059-8.

- [359] T. Murata, F. Goshima, Y. Yamauchi, T. Koshizuka, H. Takakuwa, i Y. Nishiyama, „Herpes simplex virus type 2 US3 blocks apoptosis induced by sorbitol treatment”, *Microbes Infect.*, t. 4, nr 7, s. 707–712, cze. 2002, doi: 10.1016/s1286-4579(02)01590-3.
- [360] P. D. Ogg, P. J. McDonell, B. J. Ryckman, C. M. Knudson, i R. J. Roller, „The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members”, *Virology*, t. 319, nr 2, s. 212–224, luty 2004, doi: 10.1016/j.virol.2003.10.019.
- [361] K. Geenen, H. W. Favoreel, L. Olsen, L. W. Enquist, i H. J. Nauwynck, „The pseudorabies virus US3 protein kinase possesses anti-apoptotic activity that protects cells from apoptosis during infection and after treatment with sorbitol or staurosporine”, *Virology*, t. 331, nr 1, s. 144–150, sty. 2005, doi: 10.1016/j.virol.2004.10.027.
- [362] A. Brzozowska *i in.*, „Inhibition of apoptosis in BHV-1-infected cells depends on Us3 serine/threonine kinase and its enzymatic activity”, *Virology*, t. 513, s. 136–145, sty. 2018, doi: 10.1016/j.virol.2017.09.029.
- [363] F. C. Purves, D. Spector, i B. Roizman, „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.*, t. 65, nr 11, s. 5757–5764, lis. 1991, doi: 10.1128/JVI.65.11.5757-5764.1991.
- [364] T. C. Heineman, K. Seidel, i J. I. Cohen, „The varicella-zoster virus ORF66 protein induces kinase activity and is dispensable for viral replication”, *J. Virol.*, t. 70, nr 10, s. 7312–7317, paź. 1996, doi: 10.1128/JVI.70.10.7312-7317.1996.
- [365] Y. Takashima, H. Tamura, X. Xuan, i H. Otsuka, „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.*, t. 59, nr 1, s. 23–34, sty. 1999, doi: 10.1016/s0168-1702(98)00119-1.
- [366] M. Deruelle, K. Geenen, H. J. Nauwynck, i H. W. Favoreel, „A point mutation in the putative ATP binding site of the pseudorabies virus US3 protein kinase prevents Bad phosphorylation and cell survival following apoptosis induction”, *Virus Res.*, t. 128, nr 1–2, s. 65–70, wrz. 2007, doi: 10.1016/j.virusres.2007.04.006.
- [367] D. Schumacher, C. McKinney, B. B. Kaufer, i N. Osterrieder, „Enzymatically inactive US3 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*, t. 375, nr 1, s. 37–47, maj 2008, doi: 10.1016/j.virol.2008.01.026.
- [368] S. L. Labiuk, V. Lobanov, Z. Lawman, M. Snider, L. A. Babiuk, i S. van Drunen Littel-van den Hurk, „Bovine herpesvirus-1 US3 protein kinase: critical residues and involvement in the phosphorylation of VP22”, *J. Gen. Virol.*, t. 91, nr Pt 5, s. 1117–1126, maj 2010, doi: 10.1099/vir.0.016600-0.
- [369] A. Brzozowska, *Kinaza białkowa US3 i glikoproteina gE jako mediatory transmisji międzykomórkowej alfaherpeswirusów*, Rozprawa doktorska. Gdańsk: Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 2012.
- [370] M. Panasiuk, *Molekularne mechanizmy przechodzenia alfaherpeswirusów z komórki do komórki*, Rozprawa doktorska. Gdańsk: Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 2019.
- [371] A. R. Brack, J. M. Dijkstra, H. Granzow, B. G. Klupp, i T. C. Mettenleiter, „Inhibition of Virion Maturation by Simultaneous Deletion of Glycoproteins E, I, and M of Pseudorabies Virus”, *J. Virol.*, t. 73, nr 7, s. 5364–5372, lip. 1999, Dostęp: 18 październik 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112592/>
- [372] F. Shahin *i in.*, „Bovine herpesvirus 1 tegument protein UL21 plays critical roles in viral secondary envelopment and cell-to-cell spreading”, *Oncotarget*, t. 8, nr 55, s. 94462–94480, paź. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.21776.
- [373] H. J. Nauwynck i M. B. Pensaert, „Effect of specific antibodies on the cell-associated spread of pseudorabies virus in monolayers of different cell types”, *Arch. Virol.*, t. 140, nr 6, s. 1137–1146, cze. 1995, doi: 10.1007/BF01315422.

- [374] F. Abaitua, F. R. Zia, M. Hollinshead, i P. O'Hare, „Polarized Cell Migration during Cell-to-Cell Transmission of Herpes Simplex Virus in Human Skin Keratinocytes”, *J. Virol.*, t. 87, nr 14, s. 7921–7932, lip. 2013, doi: 10.1128/JVI.01172-13.
- [375] J. C. Carmichael, H. Yokota, R. C. Craven, A. Schmitt, i J. W. Wills, „The HSV-1 mechanisms of cell-to-cell spread and fusion are critically dependent on host PTP1B”, *PLOS Pathog.*, t. 14, nr 5, s. e1007054, maj 2018, doi: 10.1371/journal.ppat.1007054.
- [376] T. H. Weller i A. H. Coons, „Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro.”, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, t. 86, nr 4, s. 789–794, sie. 1954, doi: 10.3181/00379727-86-21235.
- [377] J. Lebrun, „Cellular localization of herpes simplex virus by means of fluorescent antibody”, *Virology*, t. 2, nr 4, s. 496–510, sie. 1956, doi: 10.1016/0042-6822(56)90006-X.
- [378] U. Schnell, F. Dijk, K. A. Sjollem, i B. N. G. Giepmans, „Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging”, *Nat. Methods*, t. 9, nr 2, s. 152–158, luty 2012, doi: 10.1038/nmeth.1855.
- [379] S. E. Antinone, S. V. Zaichick, i G. A. Smith, „Resolving the Assembly State of Herpes Simplex Virus during Axon Transport by Live-Cell Imaging”, *J. Virol.*, t. 84, nr 24, s. 13019–13030, grudz. 2010, doi: 10.1128/JVI.01296-10.
- [380] W. W. Newcomb i J. C. Brown, „Time-Dependent Transformation of the Herpesvirus Tegument”, *J. Virol.*, t. 83, nr 16, s. 8082–8089, sie. 2009, doi: 10.1128/JVI.00777-09.
- [381] I. B. Hogue *i in.*, „Fluorescent Protein Approaches in Alpha Herpesvirus Research”, *Viruses*, t. 7, nr 11, s. 5933–5961, lis. 2015, doi: 10.3390/v7112915.
- [382] G. Elliott i P. O'Hare, „Intercellular Trafficking and Protein Delivery by a Herpesvirus Structural Protein”, *Cell*, t. 88, nr 2, s. 223–233, sty. 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81843-7.
- [383] P. Desai i S. Person, „Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid”, *J. Virol.*, t. 72, nr 9, s. 7563–7568, wrz. 1998, doi: 10.1128/JVI.72.9.7563-7568.1998.
- [384] P. Wild *i in.*, „Impairment of Nuclear Pores in Bovine Herpesvirus 1-Infected MDBK Cells”, *J. Virol.*, t. 79, nr 2, s. 1071–1083, sty. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.2.1071-1083.2005.
- [385] J. S. Rudd, F. Musarrat, i K. G. Kousoulas, „Development of a reliable bovine neuronal cell culture system and labeled recombinant bovine herpesvirus type-1 for studying virus-host cell interactions”, *Virus Res.*, t. 293, s. 198255, luty 2021, doi: 10.1016/j.virusres.2020.198255.
- [386] S. K. Cockrell, M. E. Sanchez, A. Erazo, i F. L. Homa, „Role of the UL25 Protein in Herpes Simplex Virus DNA Encapsidation”, *J. Virol.*, t. 83, nr 1, s. 47–57, sty. 2009, doi: 10.1128/JVI.01889-08.
- [387] K. P. Bohannon, P. J. Sollars, G. E. Pickard, i G. A. Y. 2012 Smith, „Fusion of a fluorescent protein to the pUL25 minor capsid protein of pseudorabies virus allows live-cell capsid imaging with negligible impact on infection”, *J. Gen. Virol.*, t. 93, nr 1, s. 124–129, doi: 10.1099/vir.0.036145-0.
- [388] S. E. Antinone i G. A. Smith, „Retrograde Axon Transport of Herpes Simplex Virus and Pseudorabies Virus: a Live-Cell Comparative Analysis”, *J. Virol.*, t. 84, nr 3, s. 1504–1512, luty 2010, doi: 10.1128/JVI.02029-09.
- [389] G. W. G. Luxton, S. Haverlock, K. E. Coller, S. E. Antinone, A. Pincetic, i G. A. Smith, „Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 102, nr 16, s. 5832–5837, kwi. 2005, doi: 10.1073/pnas.0500803102.
- [390] M. Donnelly i G. Elliott, „Fluorescent Tagging of Herpes Simplex Virus Tegument Protein VP13/14 in Virus Infection”, *J. Virol.*, t. 75, nr 6, s. 2575–2583, mar. 2001, doi: 10.1128/JVI.75.6.2575-2583.2001.
- [391] S. L. Labiuk, L. A. Labiuk, i S. van Drunen Littel-van den Hurk, „Major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus 1 is phosphorylated by viral US3 and cellular CK2 protein kinases”, *J. Gen. Virol.*, t. 90, nr 12, s. 2829–2839, 2009, doi: 10.1099/vir.0.013532-0.
- [392] J. Verhagen, I. Hutchinson, i G. Elliott, „Nucleocytoplasmic Shuttling of Bovine Herpesvirus 1 UL47 Protein in Infected Cells”, *J. Virol.*, t. 80, nr 2, s. 1059–1063, sty. 2006, doi: 10.1128/JVI.80.2.1059-1063.2006.

- [393] X. Xue, J. Huang, i H. Wang, „The Study of the Intercellular Trafficking of the Fusion Proteins of Herpes Simplex Virus Protein VP22”, *PLOS ONE*, t. 9, nr 6, s. e100840, cze. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0100840.
- [394] T. del Rio, T. H. Ch'ng, E. A. Flood, S. P. Gross, i L. W. Enquist, „Heterogeneity of a Fluorescent Tegument Component in Single Pseudorabies Virus Virions and Enveloped Axonal Assemblies”, *J. Virol.*, t. 79, nr 7, s. 3903–3919, kwi. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.7.3903-3919.2005.
- [395] V. A. Lobanov, L. A. Babiuk, i S. van Drunen Littel-van den Hurk, „Intracellular trafficking of VP22 in bovine herpesvirus-1 infected cells”, *Virology*, t. 396, nr 2, s. 189–202, sty. 2010, doi: 10.1016/j.virol.2009.10.022.
- [396] C. M. Crump, B. Bruun, S. Bell, L. E. Pomeranz, T. Minson, i H. M. Y. 2004 Browne, „Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins”, *J. Gen. Virol.*, t. 85, nr 12, s. 3517–3527, doi: 10.1099/vir.0.80361-0.
- [397] M. P. Taylor, T. Kramer, M. G. Lyman, R. Kratchmarov, i L. W. Enquist, „Visualization of an Alphaherpesvirus Membrane Protein That Is Essential for Anterograde Axonal Spread of Infection in Neurons”, *mBio*, t. 3, nr 2, s. e00063-12, doi: 10.1128/mBio.00063-12.
- [398] C. E. Denes, T. P. Newsome, M. Miranda-Saksena, A. L. Cunningham, i R. J. Diefenbach, „A putative WAVE regulatory complex (WRC) interacting receptor sequence (WIRS) in the cytoplasmic tail of HSV-1 gE does not function in WRC recruitment or neuronal transport”, *Access Microbiol.*, t. 3, nr 3, s. 000206, mar. 2021, doi: 10.1099/acmi.0.000206.
- [399] X. Dong *i in.*, „Anterograde Viral Tracer Herpes Simplex Virus 1 Strain H129 Transports Primarily as Capsids in Cortical Neuron Axons”, *J. Virol.*, t. 94, nr 8, s. e01957-19, mar. 2020, doi: 10.1128/JVI.01957-19.
- [400] K. P. Bohannon, Y. Jun, S. P. Gross, i G. A. Smith, „Differential protein partitioning within the herpesvirus tegument and envelope underlies a complex and variable virion architecture”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 110, nr 17, s. E1613–E1620, kwi. 2013, doi: 10.1073/pnas.1221896110.
- [401] M. P. Taylor, O. Kobiler, i L. W. Enquist, „Alphaherpesvirus axon-to-cell spread involves limited virion transmission”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 109, nr 42, s. 17046–17051, paź. 2012, doi: 10.1073/pnas.1212926109.
- [402] K. A. Barber *i in.*, „Protein Composition of the Bovine Herpesvirus 1.1 Virion”, *Vet. Sci.*, t. 4, nr 1, s. 11, luty 2017, doi: 10.3390/vetsci4010011.
- [403] E. C. Fontaine-Rodriguez, T. J. Taylor, M. Olesky, i D. M. Knipe, „Proteomics of herpes simplex virus infected cell protein 27: association with translation initiation factors”, *Virology*, t. 330, nr 2, s. 487–492, grudz. 2004, doi: 10.1016/j.virol.2004.10.002.
- [404] T. J. Taylor i D. M. Knipe, „Proteomics of Herpes Simplex Virus Replication Compartments: Association of Cellular DNA Replication, Repair, Recombination, and Chromatin Remodeling Proteins with ICP8”, *J. Virol.*, t. 78, nr 11, s. 5856–5866, cze. 2004, doi: 10.1128/JVI.78.11.5856-5866.2004.
- [405] J. T. Lester i N. A. DeLuca, „Herpes Simplex Virus 1 ICP4 Forms Complexes with TFIID and Mediator in Virus-Infected Cells ▽”, *J. Virol.*, t. 85, nr 12, s. 5733–5744, cze. 2011, doi: 10.1128/JVI.00385-11.
- [406] L. M. Wagner i N. A. DeLuca, „Temporal Association of Herpes Simplex Virus ICP4 with Cellular Complexes Functioning at Multiple Steps in PolII Transcription”, *PLoS ONE*, t. 8, nr 10, s. e78242, paź. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0078242.
- [407] K. Michael, B. G. Klupp, T. C. Mettenleiter, i A. Karger, „Composition of Pseudorabies Virus Particles Lacking Tegument Protein US3, UL47, or UL49 or Envelope Glycoprotein E”, *J. Virol.*, t. 80, nr 3, s. 1332–1339, luty 2006, doi: 10.1128/JVI.80.3.1332-1339.2006.
- [408] K. Michael, B. G. Klupp, A. Karger, i T. C. Mettenleiter, „Efficient Incorporation of Tegument Proteins pUL46, pUL49, and pUS3 into Pseudorabies Virus Particles Depends on the Presence of pUL21”, *J. Virol.*, t. 81, nr 2, s. 1048–1051, sty. 2007, doi: 10.1128/JVI.01801-06.
- [409] J. S. Loomis, R. J. Courtney, i J. W. Wills, „Binding partners for the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1”, *J. Virol.*, t. 77, nr 21, s. 11417–11424, lis. 2003, doi: 10.1128/jvi.77.21.11417-11424.2003.
- [410] A. E. Lin, T. M. Greco, K. Döhner, B. Sodeik, i I. M. Cristea, „A Proteomic Perspective of Inbuilt Viral Protein Regulation: pUL46 Tegument Protein is Targeted for Degradation by ICP0 during

- Herpes Simplex Virus Type 1 Infection”, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, t. 12, nr 11, s. 3237–3252, lis. 2013, doi: 10.1074/mcp.M113.030866.
- [411] N. Lam i G. J. Letchworth, „Bovine Herpesvirus 1 UL3.5 Interacts with Bovine Herpesvirus 1  $\alpha$ -Transinducing Factor”, *J. Virol.*, t. 74, nr 6, s. 2876–2884, mar. 2000, Dostęp: 6 grudzień 2021. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC111778/>
- [412] T. Sadaoka *i in.*, „Varicella-Zoster Virus ORF49 Functions in the Efficient Production of Progeny Virus through Its Interaction with Essential Tegument Protein ORF44”, *J. Virol.*, t. 88, nr 1, s. 188–201, sty. 2014, doi: 10.1128/JVI.02245-13.
- [413] M. Skiba, F. Glowinski, D. Koczan, T. C. Mettenleiter, i A. Karger, „Gene expression profiling of Pseudorabies virus (PrV) infected bovine cells by combination of transcript analysis and quantitative proteomic techniques”, *Vet. Microbiol.*, t. 143, nr 1, s. 14–20, cze. 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.009.
- [414] C. Bell, M. Desjardins, P. Thibault, i K. Radtke, „Proteomics analysis of herpes simplex virus type 1-infected cells reveals dynamic changes of viral protein expression, ubiquitylation, and phosphorylation”, *J. Proteome Res.*, t. 12, nr 4, s. 1820–1829, kwi. 2013, doi: 10.1021/pr301157j.
- [415] S. L. Oliver *i in.*, „An immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif in varicella-zoster virus glycoprotein B regulates cell fusion and skin pathogenesis”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 110, nr 5, s. 1911–1916, sty. 2013, doi: 10.1073/pnas.1216985110.
- [416] R. J. J. Jansens, S. Marmiroli, i H. W. Favoreel, „An Unbiased Approach to Mapping the Signaling Network of the Pseudorabies Virus US3 Protein”, *Pathog. Basel Switz.*, t. 9, nr 11, s. E916, lis. 2020, doi: 10.3390/pathogens9110916.
- [417] T. Kramer, T. M. Greco, M. P. Taylor, A. E. Ambrosini, I. M. Cristea, i L. W. Enquist, „Kinesin-3 mediates axonal sorting and directional transport of alphaherpesvirus particles in neurons”, *Cell Host Microbe*, t. 12, nr 6, s. 806–814, grudz. 2012, doi: 10.1016/j.chom.2012.10.013.
- [418] O. O. Koyuncu, D. H. Perlman, i L. W. Enquist, „Efficient Retrograde Transport of Pseudorabies Virus within Neurons Requires Local Protein Synthesis In Axons”, *Cell Host Microbe*, t. 13, nr 1, s. 54–66, sty. 2013, doi: 10.1016/j.chom.2012.10.021.
- [419] K. Radtke *i in.*, „Plus- and Minus-End Directed Microtubule Motors Bind Simultaneously to Herpes Simplex Virus Capsids Using Different Inner Tegument Structures”, *PLoS Pathog.*, t. 6, nr 7, s. e1000991, lip. 2010, doi: 10.1371/journal.ppat.1000991.
- [420] M. Skiba, T. C. Mettenleiter, i A. Karger, „Quantitative whole-cell proteome analysis of pseudorabies virus-infected cells”, *J. Virol.*, t. 82, nr 19, s. 9689–9699, paź. 2008, doi: 10.1128/JVI.00995-08.
- [421] R. Antrobus *i in.*, „Proteomic analysis of cells in the early stages of herpes simplex virus type-1 infection reveals widespread changes in the host cell proteome”, *Proteomics*, t. 9, nr 15, s. 3913–3927, sie. 2009, doi: 10.1002/pmic.200900207.
- [422] R. Rakkola, S. Matikainen, i T. A. Nyman, „Proteome analysis of human macrophages reveals the upregulation of manganese-containing superoxide dismutase after toll-like receptor activation”, *Proteomics*, t. 7, nr 3, s. 378–384, luty 2007, doi: 10.1002/pmic.200600582.
- [423] T. Li, B. A. Diner, J. Chen, i I. M. Cristea, „Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 109, nr 26, s. 10558–10563, cze. 2012, doi: 10.1073/pnas.1203447109.
- [424] J. J. Miettinen, S. Matikainen, i T. A. Nyman, „Global secretome characterization of herpes simplex virus 1-infected human primary macrophages”, *J. Virol.*, t. 86, nr 23, s. 12770–12778, grudz. 2012, doi: 10.1128/JVI.01545-12.
- [425] R. Pérez de Diego, C. Mulvey, J.-L. Casanova, i J. Godovac-Zimmermann, „Proteomics in immunity and herpes simplex encephalitis”, *Expert Rev. Proteomics*, t. 11, nr 1, s. 21–29, luty 2014, doi: 10.1586/14789450.2014.864954.
- [426] E. A. Engel, R. Song, O. O. Koyuncu, i L. W. Enquist, „Investigating the biology of alpha herpesviruses with mass spectrometry-based proteomics”, *Proteomics*, t. 15, nr 12, s. 1943–1956, cze. 2015, doi: 10.1002/pmic.201400604.



- [427] C. B. OWEN *i in.*, „Utilising proteomic approaches to understand oncogenic human herpesviruses (Review)”, *Mol. Clin. Oncol.*, t. 2, nr 6, s. 891–903, lis. 2014, doi: 10.3892/mco.2014.341.
- [428] S.-E. Ong *i in.*, „Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics”, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, t. 1, nr 5, s. 376–386, maj 2002, doi: 10.1074/mcp.m200025-mcp200.
- [429] T. H. Benedyk *i in.*, „pUL21 is a viral phosphatase adaptor that promotes herpes simplex virus replication and spread”, *PLoS Pathog.*, t. 17, nr 8, s. e1009824, sie. 2021, doi: 10.1371/journal.ppat.1009824.
- [430] W. J. D. Ouwendijk *i in.*, „Analysis of Virus and Host Proteomes During Productive HSV-1 and VZV Infection in Human Epithelial Cells”, *Front. Microbiol.*, t. 11, s. 1179, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.01179.
- [431] J. Gillen i A. Nita-Lazar, „Experimental Analysis of Viral–Host Interactions”, *Front. Physiol.*, t. 10, s. 425, kwi. 2019, doi: 10.3389/fphys.2019.00425.
- [432] M. S. Crow i I. M. Cristea, „Human Antiviral Protein IFIX Suppresses Viral Gene Expression during Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) Infection and Is Counteracted by Virus-induced Proteasomal Degradation”, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, t. 16, nr 4 Suppl 1, s. S200–S214, kwi. 2017, doi: 10.1074/mcp.M116.064741.
- [433] Joseph. Sambrook Russell, David W. ., *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [434] D. G. Gibson, „Chapter fifteen - Enzymatic Assembly of Overlapping DNA Fragments”, w *Methods in Enzymology*, t. 498, C. Voigt, Red. Academic Press, 2011, s. 349–361. doi: 10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2.
- [435] P. Desai, N. A. DeLuca, i S. Person, „Herpes simplex virus type 1 VP26 is not essential for replication in cell culture but influences production of infectious virus in the nervous system of infected mice”, *Virology*, t. 247, nr 1, s. 115–124, lip. 1998, doi: 10.1006/viro.1998.9230.
- [436] P. T. Wingfield *i in.*, „Hexon-only binding of VP26 reflects differences between the hexon and penton conformations of VP5, the major capsid protein of herpes simplex virus.”, *J. Virol.*, t. 71, nr 12, s. 8955–8961, grudz. 1997, Dostęp: 4 marzec 2022. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC230195/>
- [437] N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, i R. Y. Tsien, „Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein”, *Nat. Biotechnol.*, t. 22, nr 12, s. 1567–1572, grudz. 2004, doi: 10.1038/nbt1037.
- [438] C.-H. Nagel, K. Döhner, A. Binz, R. Bauerfeind, i B. Sodeik, „Improper Tagging of the Non-Essential Small Capsid Protein VP26 Impairs Nuclear Capsid Egress of Herpes Simplex Virus”, *PLOS ONE*, t. 7, nr 8, s. e44177, sie. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0044177.
- [439] B. He, M. Gross, i B. Roizman, „The gamma134.5 protein of herpes simplex virus 1 has the structural and functional attributes of a protein phosphatase 1 regulatory subunit and is present in a high molecular weight complex with the enzyme in infected cells”, *J. Biol. Chem.*, t. 273, nr 33, s. 20737–20743, sie. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.33.20737.
- [440] T. Zhu *i in.*, „GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  facilitates pseudorabies virus replication by maintaining de novo protein synthesis”, *Vet. Res.*, t. 52, s. 148, 2021, doi: 10.1186/s13567-021-01018-5.
- [441] W. Rozek, M. Kwasnik, A. Malinowska, K. Stasiak, M. Larska, i J. Rola, „Proteomic analysis of the secretome of equine herpesvirus-1 infected rabbit kidney cells”, *Res. Vet. Sci.*, t. 140, s. 134–141, lis. 2021, doi: 10.1016/j.rvsc.2021.08.014.
- [442] E. Sato, K. Hiromatsu, K. Murata, i S. Imafuku, „Loss of ATP2A2 Allows Herpes Simplex Virus 1 Infection of a Human Epidermis Model by Disrupting Innate Immunity and Barrier Function”, *J. Invest. Dermatol.*, t. 138, nr 12, s. 2540–2549, grudz. 2018, doi: 10.1016/j.jid.2018.05.019.
- [443] A. W. Dodson, T. J. Taylor, D. M. Knipe, i D. M. Coen, „Inhibitors of the Sodium Potassium ATPase that Impair Herpes Simplex Virus Replication Identified via a Chemical Screening Approach”, *Virology*, t. 366, nr 2, s. 340–348, wrz. 2007, doi: 10.1016/j.virol.2007.05.001.

- [444] L. Boff *i in.*, „Potential anti-herpes and cytotoxic action of novel semisynthetic digitoxigenin-derivatives”, *Eur. J. Med. Chem.*, t. 167, s. 546–561, kwi. 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.076.
- [445] F. Mou, E. G. Wills, R. Park, i J. D. Baines, „Effects of lamin A/C, lamin B1, and viral US3 kinase activity on viral infectivity, virion egress, and the targeting of herpes simplex virus U(L)34-encoded protein to the inner nuclear membrane”, *J. Virol.*, t. 82, nr 16, s. 8094–8104, sie. 2008, doi: 10.1128/JVI.00874-08.
- [446] G. L. Cano-Monreal, K. M. Wylie, F. Cao, J. E. Tavis, i L. A. Morrison, „Herpes simplex virus 2 UL13 protein kinase disrupts nuclear lamins”, *Virology*, t. 392, nr 1, s. 137–147, wrz. 2009, doi: 10.1016/j.virol.2009.06.051.
- [447] E. S. Scott i P. O’Hare, „Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection”, *J. Virol.*, t. 75, nr 18, s. 8818–8830, wrz. 2001, doi: 10.1128/jvi.75.18.8818-8830.2001.
- [448] A. Turan *i in.*, „Autophagic degradation of lamins facilitates the nuclear egress of herpes simplex virus type 1”, *J. Cell Biol.*, t. 218, nr 2, s. 508–523, luty 2019, doi: 10.1083/jcb.201801151.
- [449] M. Zhong *i in.*, „Heat-shock protein 90 promotes nuclear transport of herpes simplex virus 1 capsid protein by interacting with acetylated tubulin”, *PLoS One*, t. 9, nr 6, s. e99425, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0099425.
- [450] Y. Wang *i in.*, „Heat-shock protein 90 $\alpha$  is involved in maintaining the stability of VP16 and VP16-mediated transactivation of  $\alpha$  genes from herpes simplex virus-1”, *Mol. Med. Camb. Mass*, t. 24, nr 1, s. 65, grudz. 2018, doi: 10.1186/s10020-018-0066-x.
- [451] G. Alvisi, D. Musiani, D. A. Jans, i A. Ripalti, „An importin alpha/beta-recognized bipartite nuclear localization signal mediates targeting of the human herpes simplex virus type 1 DNA polymerase catalytic subunit pUL30 to the nucleus”, *Biochemistry*, t. 46, nr 32, s. 9155–9163, sie. 2007, doi: 10.1021/bi7002394.
- [452] M. Cai, J. Si, X. Li, Z. Zeng, i M. Li, „Characterization of the nuclear import mechanisms of HSV-1 UL31”, *Biol. Chem.*, t. 397, nr 6, s. 555–561, cze. 2016, doi: 10.1515/hsz-2015-0299.
- [453] M. Cai *i in.*, „Characterization of the subcellular localization and nuclear import molecular mechanisms of herpes simplex virus 1 UL2”, *Biol. Chem.*, t. 398, nr 4, s. 509–517, kwi. 2017, doi: 10.1515/hsz-2016-0268.
- [454] A. Esclatine, B. Taddeo, i B. Roizman, „The UL41 protein of herpes simplex virus mediates selective stabilization or degradation of cellular mRNAs”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 101, nr 52, s. 18165–18170, grudz. 2004, doi: 10.1073/pnas.0408272102.
- [455] G. E. Lee, J. W. Murray, A. W. Wolkoff, i D. W. Wilson, „Reconstitution of Herpes Simplex Virus Microtubule-Dependent Trafficking In Vitro”, *J. Virol.*, t. 80, nr 9, s. 4264–4275, maj 2006, doi: 10.1128/JVI.80.9.4264-4275.2006.
- [456] C. Cilloniz, W. Jackson, C. Grose, D. Czechowski, J. Hay, i W. T. Ruyechan, „The Varicella-Zoster Virus (VZV) ORF9 Protein Interacts with the IE62 Major VZV Transactivator”, *J. Virol.*, t. 81, nr 2, s. 761–774, sty. 2007, doi: 10.1128/JVI.01274-06.
- [457] S. S. Mathew, M. P. Della Selva, i A. D. Burch, „Modification and Reorganization of the Cytoprotective Cellular Chaperone Hsp27 during Herpes Simplex Virus Type 1 Infection”, *J. Virol.*, t. 83, nr 18, s. 9304–9312, wrz. 2009, doi: 10.1128/JVI.01826-08.
- [458] S. S. Mathew, P. W. Bryant, i A. D. Burch, „Accumulation of oxidized proteins in Herpesvirus infected cells”, *Free Radic. Biol. Med.*, t. 49, nr 3, s. 383–391, sie. 2010, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.026.
- [459] S. Awasthi *i in.*, „Antibody responses to crucial functional epitopes as a novel approach to assess immunogenicity of vaccine adjuvants”, *Vaccine*, t. 37, nr 29, s. 3770–3778, cze. 2019, doi: 10.1016/j.vaccine.2019.05.068.
- [460] R. L. Finnen i B. W. Banfield, „CRISPR/Cas9 Mutagenesis of UL21 in Multiple Strains of Herpes Simplex Virus Reveals Differential Requirements for pUL21 in Viral Replication”, *Viruses*, t. 10, nr 5, Art. nr 5, maj 2018, doi: 10.3390/v10050258.
- [461] P. K. Vaz *i in.*, „ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HERPESVIRUS FROM A FREE-RANGING EASTERN GREY KANGAROO (MACROPUS GIGANTEUS)”, *J. Wildl. Dis.*, t. 49, nr 1, s. 143–151, sty. 2013, doi: 10.7589/2012-01-027.

- [462] J. Zhao *i in.*, „Us3 and Us9 proteins contribute to the stromal invasion of bovine herpesvirus 1 in the respiratory mucosa”, *J. Gen. Virol.*, t. 98, nr 5, s. 1089–1096, doi: 10.1099/jgv.0.000764.
- [463] S. Trapp, N. Osterrieder, G. M. Keil, i M. 2003 Beer, „Mutagenesis of a bovine herpesvirus type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants”, *J. Gen. Virol.*, t. 84, nr 2, s. 301–306, doi: 10.1099/vir.0.18682-0.
- [464] L. L. Ruhge, A. G. E. Huet, J. F. Conway, i G. A. Smith, „The Apical Region of the Herpes Simplex Virus Major Capsid Protein Promotes Capsid Maturation”, *J. Virol.*, t. 92, nr 18, s. e00821-18, doi: 10.1128/JVI.00821-18.
- [465] J. Ru *i in.*, „MiR-23a Facilitates the Replication of HSV-1 through the Suppression of Interferon Regulatory Factor 1”, *PLOS ONE*, t. 9, nr 12, s. e114021, grudz. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0114021.
- [466] M. Matrosovich, T. Matrosovich, W. Garten, i H.-D. Klenk, „New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays”, *Virol. J.*, t. 3, nr 1, s. 63, sie. 2006, doi: 10.1186/1743-422X-3-63.
- [467] P. Herzog, C. Drosten, i M. A. Müller, „Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells”, *Virol. J.*, t. 5, s. 138, lis. 2008, doi: 10.1186/1743-422X-5-138.
- [468] M. Fukuta *i in.*, „Discrepancies in Infectivity of Flavivirus and SARS-CoV-2 Clinical Samples: An Improved Assay for Infectious Virus Shedding and Viremia Assessment”, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, t. 18, nr 18, Art. nr 18, sty. 2021, doi: 10.3390/ijerph18189845.
- [469] R. A. Bowden *i in.*, „A Comparison of Filtered Leukocyte-Reduced and Cytomegalovirus (CMV) Seronegative Blood Products for the Prevention of Transfusion-Associated CMV Infection After Marrow Transplant”, s. 6.
- [470] J. W. Jackson i T. Sparer, „There Is Always Another Way! Cytomegalovirus’ Multifaceted Dissemination Schemes”, *Viruses*, t. 10, nr 7, s. E383, lip. 2018, doi: 10.3390/v10070383.
- [471] N. Reuter, B. Kropff, W. J. Britt, M. Mach, i M. Thomas, „Neutralizing Antibodies Limit Cell-Associated Spread of Human Cytomegalovirus in Epithelial Cells and Fibroblasts”, *Viruses*, t. 14, nr 2, Art. nr 2, luty 2022, doi: 10.3390/v14020284.
- [472] C. L. Jacob, L. Lamorte, E. Sepulveda, I. C. Lorenz, A. Gauthier, i M. Franti, „Neutralizing antibodies are unable to inhibit direct viral cell-to-cell spread of human cytomegalovirus”, *Virology*, t. 444, nr 1, s. 140–147, wrz. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.06.002.
- [473] A. Krawczyk *i in.*, „Impact of Valency of a Glycoprotein B-Specific Monoclonal Antibody on Neutralization of Herpes Simplex Virus”, *J. Virol.*, t. 85, nr 4, s. 1793–1803, luty 2011, doi: 10.1128/JVI.01924-10.
- [474] S. Gershburg, J. Geltz, K. E. Peterson, W. P. Halford, i E. Gershburg, „The UL13 and US3 Protein Kinases of Herpes Simplex Virus 1 Cooperate to Promote the Assembly and Release of Mature, Infectious Virions”, *PloS One*, t. 10, nr 6, s. e0131420, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0131420.
- [475] J. L. Arias-Arias, E. Corrales-Aguilar, i R. A. Mora-Rodríguez, „A Fluorescent Real-Time Plaque Assay Enables Single-Cell Analysis of Virus-Induced Cytopathic Effect by Live-Cell Imaging”, *Viruses*, t. 13, nr 7, s. 1193, cze. 2021, doi: 10.3390/v13071193.
- [476] D. Sheinboim, M. Hindiyeh, E. Mendelson, M. Albeck, B. Sredni, i S. Dovrat, „The immunomodulator, ammonium trichloro[1,2-ethanediolato-O,O’]-tellurate, suppresses the propagation of herpes simplex virus 2 by reducing the infectivity of the virus progeny”, *Int. J. Mol. Med.*, t. 36, nr 1, s. 231–238, lip. 2015, doi: 10.3892/ijmm.2015.2197.
- [477] S. Miyatake, A. Iyer, R. L. Martuza, i S. D. Rabkin, „Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication”, *J. Virol.*, t. 71, nr 7, s. 5124–5132, lip. 1997, doi: 10.1128/jvi.71.7.5124-5132.1997.
- [478] A. L.-A. Monjo *i in.*, „Photodynamic Inactivation of Herpes Simplex Viruses”, *Viruses*, t. 10, nr 10, Art. nr 10, paź. 2018, doi: 10.3390/v10100532.
- [479] M. Krautwald, C. Maresch, B. G. Klupp, W. Fuchs, i T. C. Y. 2008 Mettenleiter, „Deletion or green fluorescent protein tagging of the pUL35 capsid component of pseudorabies virus impairs virus replication in cell culture and neuroinvasion in mice”, *J. Gen. Virol.*, t. 89, nr 6, s. 1346–1351, doi: 10.1099/vir.0.83652-0.

- [480] P. L. Ward, W. O. Ogle, i B. Roizman, „Assemblons: nuclear structures defined by aggregation of immature capsids and some tegument proteins of herpes simplex virus 1”, *J. Virol.*, t. 70, nr 7, s. 4623–4631, lip. 1996, doi: 10.1128/JVI.70.7.4623-4631.1996.
- [481] A. de Bruyn Kops, S. L. Uprichard, M. Chen, i D. M. Knipe, „Comparison of the intranuclear distributions of herpes simplex virus proteins involved in various viral functions”, *Virology*, t. 252, nr 1, s. 162–178, grudz. 1998, doi: 10.1006/viro.1998.9450.
- [482] C. Lamberti i S. K. Weller, „The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments”, *J. Virol.*, t. 72, nr 3, s. 2463–2473, mar. 1998, doi: 10.1128/JVI.72.3.2463-2473.1998.
- [483] I. B. Hogue, J. Jean, A. D. Esteves, N. S. Tanneti, J. Scherer, i L. W. Enquist, „Functional Carboxy-Terminal Fluorescent Protein Fusion to Pseudorabies Virus Small Capsid Protein VP26”, *J. Virol.*, t. 92, nr 1, s. e01193-17, grudz. 2017, doi: 10.1128/JVI.01193-17.
- [484] T. H. Ch’ng i L. W. Enquist, „Neuron-to-cell spread of pseudorabies virus in a compartmented neuronal culture system”, *J. Virol.*, t. 79, nr 17, s. 10875–10889, wrz. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.17.10875-10889.2005.
- [485] S.-S. Park, W. W. Wu, Y. Zhou, R.-F. Shen, B. Martin, i S. Maudsley, „Effective correction of experimental errors in quantitative proteomics using stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)”, *J. Proteomics*, t. 75, nr 12, s. 3720–3732, cze. 2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.035.
- [486] M. F. Ahmed, „Studies of viral and cellular proteins involved in herpes simplex virus type-1 egress”, Thesis, University of Cambridge, 2019. doi: 10.17863/CAM.35587.
- [487] J. A. Corcoran, H. A. Saffran, B. A. Duguay, i J. R. Smiley, „Herpes simplex virus UL12.5 targets mitochondria through a mitochondrial localization sequence proximal to the N terminus”, *J. Virol.*, t. 83, nr 6, s. 2601–2610, mar. 2009, doi: 10.1128/JVI.02087-08.
- [488] M. Tanaka, T. Sata, i Y. Kawaguchi, „The product of the Herpes simplex virus 1 UL7 gene interacts with a mitochondrial protein, adenine nucleotide translocator 2”, *Virol. J.*, t. 5, s. 125, paź. 2008, doi: 10.1186/1743-422X-5-125.
- [489] Y. Hirohata *i in.*, „Interactome analysis of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein H”, *Microbiol. Immunol.*, t. 59, nr 6, s. 331–337, cze. 2015, doi: 10.1111/1348-0421.12255.
- [490] H. Suk i D. M. Knipe, „Proteomic analysis of the herpes simplex virus 1 virion protein 16 transactivator protein in infected cells”, *Proteomics*, t. 15, nr 12, s. 1957–1967, cze. 2015, doi: 10.1002/pmic.201500020.
- [491] H. Ceulemans i M. Bollen, „Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button”, *Physiol. Rev.*, t. 84, nr 1, s. 1–39, sty. 2004, doi: 10.1152/physrev.00013.2003.
- [492] P. T. W. Cohen, „Protein phosphatase 1--targeted in many directions”, *J. Cell Sci.*, t. 115, nr Pt 2, s. 241–256, sty. 2002, doi: 10.1242/jcs.115.2.241.
- [493] G. B. G. Moorhead, L. Trinkle-Mulcahy, i A. Ulke-Lemée, „Emerging roles of nuclear protein phosphatases”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, t. 8, nr 3, s. 234–244, mar. 2007, doi: 10.1038/nrm2126.
- [494] M. Bollen, W. Peti, M. J. Ragusa, i M. Beullens, „The extended PP1 toolkit: designed to create specificity”, *Trends Biochem. Sci.*, t. 35, nr 8, s. 450–458, sie. 2010, doi: 10.1016/j.tibs.2010.03.002.
- [495] S. Lemaire i M. Bollen, „Protein phosphatase-1: dual activity regulation by Inhibitor-2”, *Biochem. Soc. Trans.*, t. 48, nr 5, s. 2229–2240, paź. 2020, doi: 10.1042/BST20200503.
- [496] M. J. Hubbard i P. Cohen, „Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 2. Catalytic subunit translocation is a mechanism for reversible inhibition of activity toward glycogen-bound substrates”, *Eur. J. Biochem.*, t. 186, nr 3, s. 711–716, grudz. 1989, doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15264.x.
- [497] E. Heroles, B. Lesage, J. Görnemann, M. Beullens, L. Van Meervelt, i M. Bollen, „The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity”, *FEBS J.*, t. 280, nr 2, s. 584–595, 2013, doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08547.x.
- [498] A. Hendrickx *i in.*, „Docking Motif-Guided Mapping of the Interactome of Protein Phosphatase-1”, *Chem. Biol.*, t. 16, nr 4, s. 365–371, kwi. 2009, doi: 10.1016/j.chembiol.2009.02.012.

- [499] P. Wakula, M. Beullens, H. Ceulemans, W. Stalmans, i M. Bollen, „Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1”, *J. Biol. Chem.*, t. 278, nr 21, s. 18817–18823, maj 2003, doi: 10.1074/jbc.M300175200.
- [500] T. D. Hurley *i in.*, „Structural basis for regulation of protein phosphatase 1 by inhibitor-2”, *J. Biol. Chem.*, t. 282, nr 39, s. 28874–28883, wrz. 2007, doi: 10.1074/jbc.M703472200.
- [501] M. Terrak, F. Kerff, K. Langsetmo, T. Tao, i R. Dominguez, „Structural basis of protein phosphatase 1 regulation”, *Nature*, t. 429, nr 6993, s. 780–784, cze. 2004, doi: 10.1038/nature02582.
- [502] M. E. Davis *i in.*, „Antagonism of the Phosphatase PP1 by the Measles Virus V Protein Is Required for Innate Immune Escape of MDA5”, *Cell Host Microbe*, t. 16, nr 1, s. 19–30, lip. 2014, doi: 10.1016/j.chom.2014.06.007.
- [503] T. Ammosova *i in.*, „Nuclear Targeting of Protein Phosphatase-1 by HIV-1 Tat Protein \*”, *J. Biol. Chem.*, t. 280, nr 43, s. 36364–36371, paź. 2005, doi: 10.1074/jbc.M503673200.
- [504] D. J. Owen, C. M. Crump, i S. C. Graham, „Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses”, *Viruses*, t. 7, nr 9, s. 5084–5114, wrz. 2015, doi: 10.3390/v7092861.
- [505] A. Traweger, G. Wiggin, L. Taylor, S. A. Tate, P. Metalnikov, i T. Pawson, „Protein phosphatase 1 regulates the phosphorylation state of the polarity scaffold Par-3”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 105, nr 30, s. 10402–10407, lip. 2008, doi: 10.1073/pnas.0804102105.

## Dodatkowe materiały

Dodatkowe materiały znajdują się na nośniku USB dołączonym do pracy doktorskiej.

**Film 1: Przykładowy film poklatkowy pokazujący prędkość CTC fluorescencyjnego rekombinanta BHV-1 niosącego gen kodujący glikoproteinę gETM<sup>1</sup> w fuzji z białkiem GFP.** Zielony: fluorescencja gETM<sup>1</sup>-GFP. Obserwacje prowadzono we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym Leica SP8X, wyposażonym w komorę przyżyciową (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) przy użyciu obiektywu 63x. Obraz zbierano od 8 hpi do 12 hpi, co 12 s. Lewy górny róg: czas względny (czas trwania mikroskopowej analizy przyżyciowej); prawy dolny róg: skala.

**Film 2: Przykładowy film poklatkowy pokazujący tempo translokacji glikoproteiny gE w fuzji z białkiem GFP w komórkach MDBK zainfekowanych BHV-1 gE-GFP.** Zielony: fluorescencja gE-GFP. Obserwacje prowadzono we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym Leica SP8X, wyposażonym w komorę przyżyciową (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) przy użyciu obiektywu 63x. Obraz zbierano od 8 hpi do 18 hpi, co 12 s. Lewy górny róg: czas względny (czas trwania mikroskopowej analizy przyżyciowej); prawy dolny róg: skala.

**Film 3: Przykładowy film poklatkowy pokazujący tempo translokacji glikoproteiny gE w fuzji z białkiem GFP w komórkach MDBK zainfekowanych BHV-1 gE-GFP ΔUS3.** Zielony: fluorescencja gE-GFP. Obserwacje prowadzono we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym Leica SP8X, wyposażonym w komorę przyżyciową (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) przy użyciu obiektywu 63x. Obraz zbierano od 8 hpi do 18 hpi, co 12 s. Lewy górny róg: czas względny (czas trwania mikroskopowej analizy przyżyciowej); prawy dolny róg: skala.

**Film 4: Przykładowy film poklatkowy pokazujący tempo translokacji glikoproteiny gE w fuzji z białkiem GFP w bydłych fibroblastach zainfekowanych BHV-1 gE-GFP.** Zielony: fluorescencja gE-GFP. Obserwacje prowadzono we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym Leica SP8X, wyposażonym w komorę przyżyciową (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) przy użyciu obiektywu 63x. Obraz zbierano od 8 hpi do 18 hpi, co 12 s. Lewy górny róg: czas względny (czas trwania mikroskopowej analizy przyżyciowej); prawy dolny róg: skala.

**Film 5: Przykładowy film poklatkowy pokazujący tempo translokacji glikoproteiny gE w fuzji z białkiem GFP w bydłych fibroblastach zainfekowanych BHV-1 gE-GFP ΔUS3.** Zielony: fluorescencja gE-GFP. Obserwacje prowadzono we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym Leica SP8X, wyposażonym w komorę przyżyciową (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) przy użyciu obiektywu 63x. Obraz zbierano od 8 hpi do 18 hpi, co 12 s. Lewy górny róg: czas względny (czas trwania mikroskopowej analizy przyżyciowej); prawy dolny róg: skala.

**Film 6: Obrazowanie przyżyciowe infekcji BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry w pojedynczej komórce linii MDBK.** Na filmie widoczna lokalizacja jądrowa nowo składanych kapsydów wirusowych, lokalizacja gE-GFP w błonie komórkowej oraz pojedyncze wiriony w cytoplazmie (żółte punkty) i w cienkich połączeniach adhezyjnych. Czerowny: VP26-

mCherry; zielony: gE-GFP. Obrazy zbierano we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym Leica SP8X, wyposażonym w komorę przyżyciową (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), co 12 s, przy użyciu obiektywu 63x. Prawy dolny róg: czas względny (czas trwania mikroskopowej analizy przyżyciowej); lewy dolny róg: skala.

**Film 7: Transmisja rekombinanta BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry poprzez TNT w komórkach linni KOP-R.** Film poklatkowy pokazuje fluorescencyjne białka wirusowe przemieszczające się wewnątrz TNT w środowisku przeciwciał neutralizujących wirusa zewnątrzkomórkowego. Czerwony: kapsydy wirusowe (VP26-mCherry); zielony: glikoproteina gE-GFP. Obrazy zbierano we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym Leica SP8X, wyposażonym w komorę przyżyciową (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), co 10 s, przy użyciu obiektywu 63x. Lewy dolny róg: czas względny (czas trwania mikroskopowej analizy przyżyciowej); prawy dolny róg: skala.

**Film 8: Transmisja rekombinanta BHV-1 gE-GFP VP26-mCherry poprzez TNT w bydlęcych fibroblastach.** Film poklatkowy pokazuje fluorescencyjne białka wirusowe przemieszczające się wewnątrz TNT w środowisku przeciwciał neutralizujących wirusa zewnątrzkomórkowego. Czerwony: kapsydy wirusowe (VP26-mCherry); zielony: glikoproteina gE-GFP. Obrazy zbierano we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym Leica SP8X, wyposażonym w komorę przyżyciową (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), co 18 s, przy użyciu obiektywu 63x. Lewy dolny róg: czas względny (czas trwania mikroskopowej analizy przyżyciowej); prawy dolny róg: skala.