

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jitka Lišková

Role tunneling nanotubes v životních cyklech virů

Tunneling nanotubes and life cycles of viruses

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lenka Horníková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 03.05. 2022

Jitka Lišková

Poděkování

Velmi děkuji paní RNDr. Lence Horníkové, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, za cenné rady, odbornou spolupráci, trpělivost a ochotu, které mi pomohly při vypracování této práce.

Abstrakt

Tunneling nanotubes jsou jedním z typů mezibuněčných spojů. Jedná se o tenké membránové výběžky tvořené především F-aktinem, které vytváří síťovitou strukturu mezi buňkami. S jejich pomocí dochází k transportu buněčných organel, iontů a proteinů mezi buňkami. Také se díky nim mohou rozšiřovat i vnitrobuněčné patogeny jako bakterie a především viry. Transport celých virionů anebo virových proteinů zprostředkovaný strukturami tunneling nanotubes byl popsán u obalených virů například z čeledí Retroviridae, Herpesviridae nebo Ortomyxoviridae. Viry z těchto čeledí využívají nanotrubic k šíření vlastního virového potomstva do neinfikovaných buněk zcela skrytě imunitnímu systému hostitele.

Klíčová slova: Tunneling nanotubes, mezibuněčný přenos, transport, virus, přenos viru

Abstract

Tunneling nanotubes are a specific type of an intercellular junctions. These structures are thin long protrusions of cellular membrane containing mainly F-actin and form connections between the cells. These structures facilitate intercellular transport and the cargo transported by tunneling nanotubes is very variable – from cellular organelles to ions and proteins. Moreover, intracellular pathogens, like bacteria and viruses can use these structures to spread in the organism. Transport of the whole virions or viral proteins mediated by tunneling nanotubes was described for several families of enveloped viruses, e.g. Retroviruses, Herpesviruses or Orthomyxoviruses. Viruses from these families use nanotubes to spread their own viral progeny to uninfected cells and this type of transport allows them to escape from control of the host's immune system.

Key words: Tunneling nanotubes, intercellular transfer, transport, virus, virus spreading

Seznam zkratek

Akt	proteinkináza B
Bax	Bcl-2-asociovaný X protein, regulátor apoptózy BAX
BoHV-1	bovinní herpesvirus 1
Cdc42	cell division control protein 42 homolog, serin/threoninová kináza
E	virový obalový protein (glykoprotein)
Env	envelope protein, obalový protein viru HIV-1
F	fúzní protein u HMPV
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
gp, GP proteiny	virové glykoproteiny
Gag	group specific antigen, skupinově specifický antigen retrovirů
HA	hemaglutinin, glykoprotein viru chřipky
HIVI-1	virus lidské imunodeficiency
HMPV	lidský metapneumovirus
HTLV-1	virus lidské T-buněčné leukemie typu 1
hpi	hodin po infekci
IgA, IgG	imunoglobulin A, imunoglobulin G
IL10	interleukin 10
LST1	leukocyte specific transcript 1 protein, protein transkriptu 1 specifický pro leukocyty
M	virový matrixový protein
M2	iontovými kanál u viru chřipky
M-Sec	neboli TNFAIP2, tumor necrosis factor alpha-induced protein 2, faktor nádorové nekrózy alfa-indukovaný protein 2
Mtb	Mycobacterium tuberculosis
mTOR	mammalian target of rapamycin, serin/threonin kináza
Myo10	myosin X
N	virový nukleoprotein
NA	neuraminidáza, glykoprotein viru chřipky
Nef	negative regulatory factor, také F-protein viru HIV-1
NP	nukleoprotein viru chřipky
oA β	oligomeric amyloid- β , oligomerní amyloid- β
P	fosfoprotein viru HMPV
p53	tumor protein p53, tumor supresorový gen
p8	pomocný protein viru HTLV-1

PC12	feochromocytomové buňky
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PRRSV	virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat
PRV	virus Pseudorabies
Rab proteiny	Ras associated binding proteins, součást rodiny Ras G proteinů
Rac1	Ras related C3 botulinum toxin substrate 1, malý GTP vazebný protein
RalA	Ras like proto oncogene A, součást rodiny Ras GTPáz
Ras	Rat sarcoma virus, GTPáza
RhoA	Ras homolog family member A, součástí Ras GTPáz
Tau	tubulin associated unit
Tax	tax gene product, transkripční aktivátor u viru HTLV-1
TNT	tunneling nanotube, tunelovací nanotrubičky
Us3	serin-threoninkináza herpesvirů
VP26	kapsidový protein herpesvirů

Obsah

1. Úvod	1
2. Tunneling nanotubes.....	2
2.1. Charakteristika tunneling nanotubes	2
2.2. Buněčné proteiny podílející se na tvorbě TNT.....	6
2.2.1. M-Sec	6
2.2.2. Myo10.....	6
2.2.3. RalA.....	7
2.2.4. Rho GTPázy	7
2.2.5. LST1	8
2.2.6. Proteiny z rodiny Rab GTPáz.....	8
2.2.7. Proteiny spojené s apoptózou	9
2.3. Biologická funkce TNT	9
3. Role tunneling nanotubes v přenosu virů z buňky do buňky.....	12
3.1. Retroviry	12
3.1.1. Virus lidské imunodeficiencie (HIV-1).....	12
3.1.2. Virus lidské T-buněčné leukemie typu 1 (HTLV-1)	17
3.2. Herpesviry	18
3.3. Virus chřipky	21
3.4. Lidský metapneumovirus (HMPV)	23
3.5. Virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRSV).....	25
4. Závěr.....	28
5. Seznam literatury.....	29
6. Zdroj z internetu	33

1. Úvod

Viry jsou intracelulární parazité. Pro realizaci svého životního cyklu potřebují buněčný aparát. Po vstupu viru do buňky dochází k uvolnění virového genomu a následovanou transkripcí virových mRNA, translací virových proteinů a replikací virových genomů. Následuje sestavení virionů, které jsou uvolněny pučením nebo lyzí buňky do okolního prostředí, kde mohou obdobným způsobem infikovat další buňky nebo se šířit z jedince na jedince. Toho „klasické“ šíření mezi buňkami využívají všechny živočišné viry. Po uvolnění z buněk se virus šíří difúzí v extracelulárním prostoru, což má své výhody, protože při tom není přenos viru omezen buněčnými kontakty. Takto se virus sice může v rámci organismu šířit i na velké vzdálenosti, ale zároveň může být odhalen a neutralizován imunitním systémem. Proto si různé virové čeledi vyvinuly i různé alternativní způsoby přenosu virionů, při kterých zůstává virus skryt imunitnímu systému.

Některé viry mají schopnost indukovat fúzi sousedních buněk za vzniku syncytií. Jedná se například o paramyxoviry, herpesviry nebo třeba retroviry. Na plazmatické membráně buněk infikovaných viry z těchto čeledí se vyskytuje vysoká koncentrace fúzních proteinů, což za určitých podmínek, jako je třeba nízké pH nebo přítomnost specifických receptorů, může způsobit fúzi buněk a jejich následnou infekci. Dalším alternativním způsobem šíření viru je tvorba aktinových komet, jejichž vznik způsobuje infekce poxvirem. Aktinové komety jsou tvořeny polymerací aktinu a na jejich špičce je umístěn virion, který je tímto způsobem přesouván k dalším buňkám (shrnutí z: Cifuentes-Munoz et al., 2020).

Viry se mohou šířit také prostřednictvím struktur, které buňky přirozeně tvoří. Mezi tyto struktury patří extracelulární vezikuly, konkrétně exosomy, u kterých byla prokázána role v přenosu virionů např. u enterovirů nebo u viru hepatitidy C (shrnutí z: Cifuentes-Munoz et al., 2020).

Další takovou strukturou jsou filopodie, což jsou tenké membránové výčnělky složené z F-aktinu. Účastní se mnoha buněčných procesů, jako například hojení ran, fagocytóza, zprostředkovávají interakci mezi buňkami, jejich migraci i adhezi k extracelulární matrix. Podobnými buněčnými strukturami jsou i tunneling nanotubes (TNT), které slouží jak ke komunikaci mezi buňkami, tak si buňky jejich prostřednictvím mohou měnit různé substráty. Tyto struktury jsou proto ideální pro alternativní šíření mezi buňkami (shrnutí z: Cifuentes-Munoz et al., 2020).

Cílem této práce bylo tedy shrnout, které viry využívají TNT pro šíření do okolních buněk.

2. Tunneling nanotubes

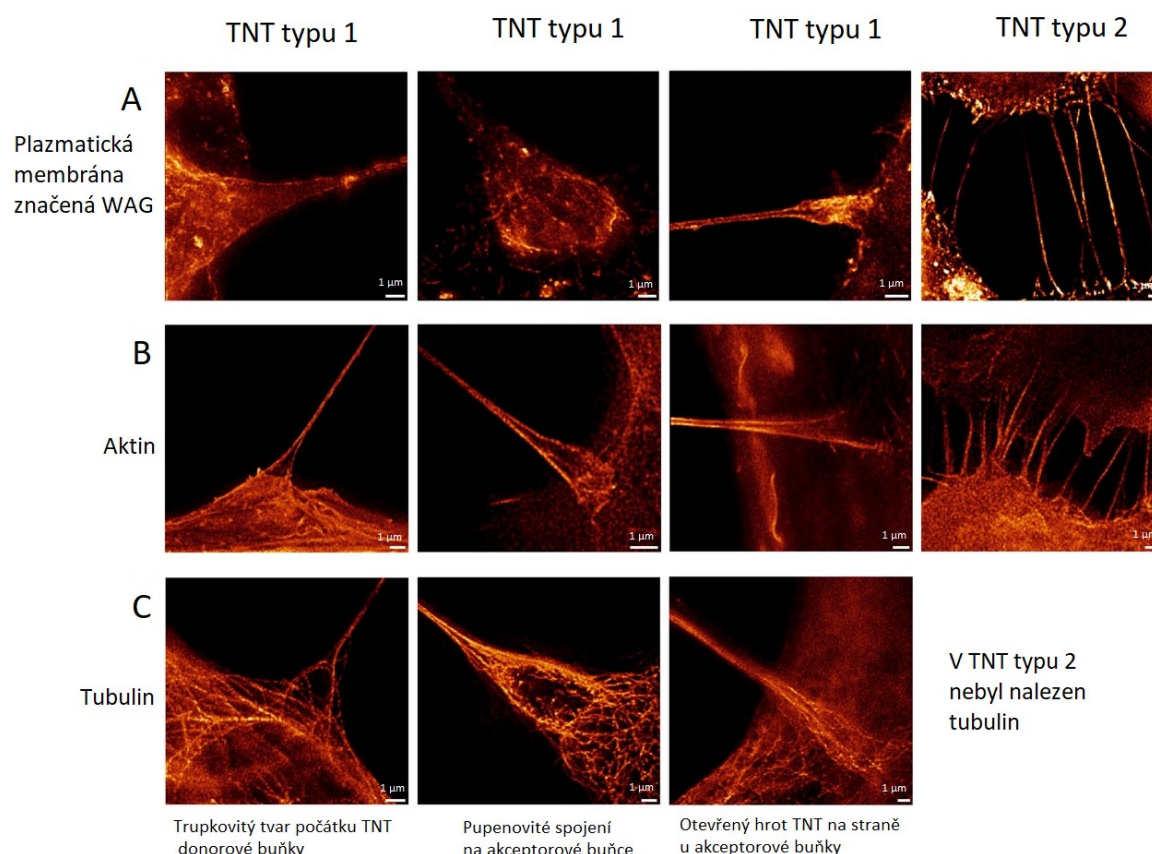
2.1. Charakteristika tunneling nanotubes

Tunneling nanotubes (TNT) jsou mezibuněčné spoje, které byly poprvé popsány v roce 2004 týmem A. Rustoma. Byly definovány jako nanotrubičky, jenž se nedotýkaly substrátu, byly odolné vůči ošetření trypsinem a složeny pouze z F-aktinu (Rustom et al., 2004). Tato definice byla později vyvrácena, protože se zjistilo, že TNT mohou mít různá složení a obsahovat další proteiny jako například myosin Va, tubulin i N-kadheriny a β -kateniny (Hanna et al., 2017; Lokar et al., 2010; Önfelt et al., 2006; Rustom et al., 2004; Schiller et al., 2013). Tyto spoje se tvoří mezi různými druhy buněk jako jsou astrocyty, B-lymfocyty, T-lymfocyty, nervovými buňkami i epiteliálními buňkami a jsou schopné přenášet různé druhy nákladu, jako je endoplazmatické retikulum, endozomy, mitochondrie, lysosomy, Golgiho komplex, RNA molekuly, vápník ale také i viry a bakterie (Eugenin et al., 2009; Kim et al., 2019; Kumar et al., 2017; Osteikoetxea-Molnár et al., 2016; Rustom et al., 2004; Sowinski et al., 2008; Wang et al., 2011; Watkins and Salter, 2005; Zhu et al., 2016).

TNT jsou velmi křehké struktury, které se snadno poškodí, a proto je složité je pozorovat (Rustom et al., 2004). Navíc se jich při kultivaci na Petriho miskách vytvoří menší počet. Práce s nimi je proto složitá, snadno se fragmentují jak při fixaci, tak i jen při pouhé manipulaci se vzorky, což má za následek zničení většiny TNT (Watkins and Salter, 2005). Pro lepší pozorování a charakterizaci těchto struktur byla proto použita kombinace několika mikroskopických metod – kryo-fluorescenční mikroskopie s kryo-elektronovou mikroskopií a kryo-elektronovou tomografií. Za použití těchto metod se zjistilo, že většina TNT, které se jevíly jako jedna struktura, jsou ve skutečnosti svazek složený z jednotlivých TNT s vlastní plazmatickou membránou. Jednotlivé TNT ze svazku byly sestaveny většinou paralelně, někdy byly spletené přes sebe. Tyto svazky se skládaly ze 2 až 11 jednotlivých vláken TNT, vlákna měla průměr kolem 123 nm a celý svazek TNT měl průměr mezi 145 až 700 nm. Jednotlivé nanotrubičky ve svazku se také vzájemně lišily. Většina měla průměr pod 200 nm, byly pozorovány ale i silnější TNT, s průměrem až 500 nm. Pokud byl transportovaný materiál objemnější než průměr nanotrubičky, tak docházelo při transportu k jejímu vyboulení. Vzdálenost mezi jednotlivými TNT ve svazku byla mezi 8 až 90 nm, ale někdy mohly být vzdáleny až 200 nm. Dále bylo zkoumáno, jak spolu interagují jednotlivé nanotrubičky ve svazku. V TNT byl detekován N-kadherin a předpokládá se, že jednotlivé nanotrubičky spolu interagují pravděpodobně prostřednictvím tohoto proteinu (Sartori-Rupp et al., 2019).

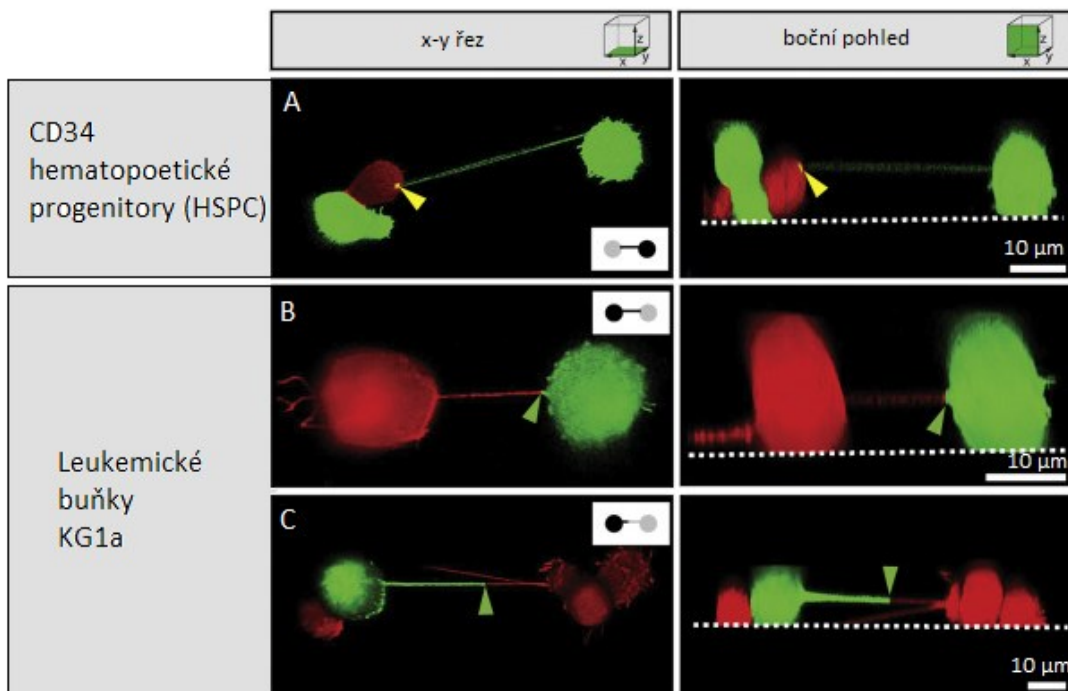
Na základě složení a morfologie byly TNT rozděleny na dva typy. TNT typu 1 (Obr. 1),

byly složeny hlavně z aktinu, ale byly v nich nalezeny i mikrotubuly. Tvořily se především na začátku kultivace buněk, kdy byla nízká jejich hustota v kultuře (Bénard et al., 2015). Nanotrubičky byly tlustší, nevětvené a dosahovaly šířky mezi 100 až 650 nm (Bénard et al., 2015; Schiller et al., 2013). Vznikly po kontaktu oddělovajících se buněk až do vzdálenosti 100 μm a mohly zůstat stabilní až několik hodin (Lou et al., 2012; Önfelt et al., 2006; Veranič et al., 2008). TNT nebyly pozorovány pokud byla vzdálenost jednotlivých buněk větší než 100 μm (Lokar et al., 2010). U TNT typu 2 nebyl detekován tubulin. Spojovaly pouze buňky v těsné blízkosti, proto se tvořily hlavně v pozdějších fázích kultivace, kdy buňky dosahují vyšších hustot (Bénard et al., 2015). Jednalo se o tenčí nanotrubičky, které se mohly i větvit a jejich průměr byl kolem 70 až 200 nm (Bénard et al., 2015; Schiller et al., 2013). Tyto TNT rostly jako filopodie, kdy došlo k postupnému prodlužování nanotrubičky, až se nakonec dotkly plazmatické membrány cílové buňky, do maximální délky 30 μm , a často se vyskytovaly ve svazku (Hase et al., 2009; Veranič et al., 2008). Stabilita těchto spojení byla nižší, avšak může trvat až několik desítek minut (Obr. 1) (Veranič et al., 2008).



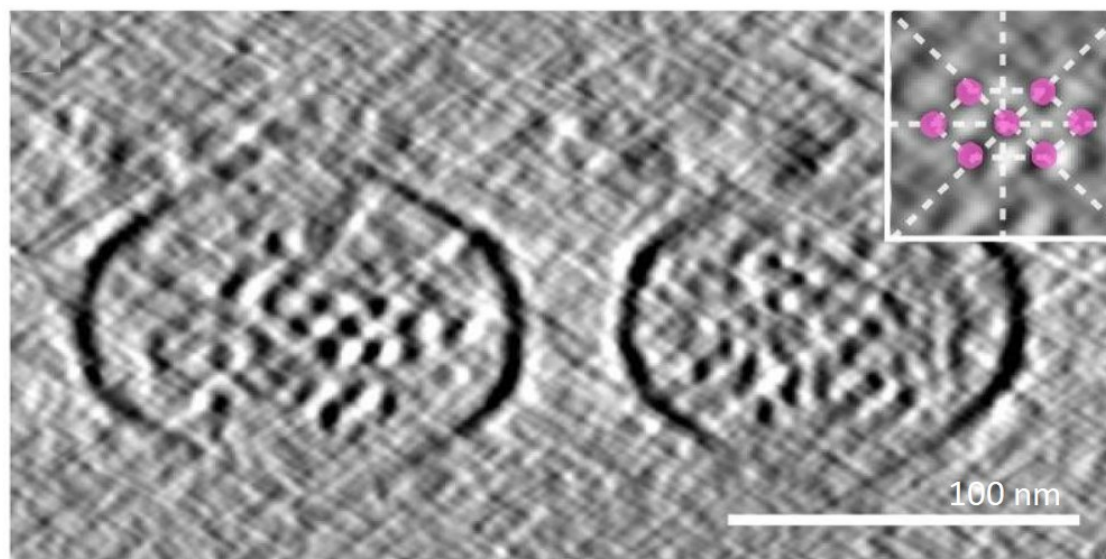
Obrázek 1: Identifikace dvou typů TNT na základě jejich složení a morfologie. Zobrazeno metodou konfokální mikroskopie s vysokým rozlišením nanoskopie (STED). Fluorescenčně označeny membrány (detekce pomocí barviva WGA), F-aktin nebo tubulin. Na snímcích je patrné, že TNT typu 1 i 2 jsou složeny z F-aktinu. Dále je díky nim patrné, že TNT typu 2 na rozdíl od typu 1 neobsahují tubulin. Dále lze pozorovat, že TNT typu 2 se tvoří s vyšší hustotou a na krátké vzdálenosti. Převzato a upraveno z: Bénard et al., 2015.

TNT se tvoří de novo nad substrátem na apikální části buňky několik hodin po začátku kultivace, jakmile buňky začnou přisedat (Watkins and Salter, 2005; Zhu et al., 2016). Avšak mechanismus jejich vzniku je různý. První možnost je, že TNT jsou vytvořeny donorovou buňkou, druhou možností je vznik nanotrubic z akceptorové buňky a poslední možností je vznik TNT, kdy dojde ke splynutí dvou vznikajících nanotrubic z donorové a akceptorové buňky (Obr. 2). Všechny tyto způsoby vzniku TNT byly pozorovány u kultivovaných buněk *in vivo* (Reichert et al., 2016). Nanotrubic jsou více tvořeny v prostředí, kde jsou buňky blíže u sebe a zároveň se na jednu buňku mohou vytvořit i desítky TNT, v maximu bylo nalezeno až 75 TNT na buňku (Watkins and Salter, 2005). Některé nanotrubic mohou být otevřené v místě kontaktu s plazmatickou membránou buňky a tím přímo propojit cytoplazmu spojených buněk, avšak podle jiných studií se jedná o struktury s uzavřeným koncem (Reichert et al., 2016; Sartori-Rupp et al., 2019; Sowinski et al., 2008). Nicméně, TNT vzájemně propojují jednotlivé buňky a navíc jsou schopny propojit současně více buněk, díky čemuž se vytvoří síť, skrze kterou spolu mohou buňky vzájemně komunikovat (Önfelt et al., 2004).



Obrázek 2: Zobrazení možností vzniku TNT, pomocí vizualizace dvou odlišně obarvených plazmatických membránách buněk. Prezentovány jsou jednotlivé optické řezy. Fluorescenčně byly obarveny plazmatické membrány buněk fluorescenčními barvivy DiO a DiI. Následně byly odlišně obarvené buňky smíchány a kultivovány. 3D zobrazení buněk v orientaci řezů x-y a bočním pohledem pro potvrzení, že jde o TNT, protože se nachází nad substrátem. Převzato a upraveno z: Reichert et al., 2016.

Pro tvorbu TNT je zcela nepostradatelný polymerovaný aktin. Pokud byla inhibována polymerace aktinu latrunculinem-B, došlo k výraznému snížení tvorby TNT (Hanna et al., 2017; Rustom et al., 2004). Aktinová vlákna jsou v jednotlivých TNT uspořádány do šestiúhelníku se vzdáleností 9,9 nm mezi sebou (Obr. 3) (Sartori-Rupp et al., 2019). Mikrotubuly se mohou v TNT také vyskytovat, ale nejsou esenciální pro jejich vytvoření. Po přidání inhibitoru polymerace mikrotubulů nedošlo ke snížení množství vytvořených TNT (Hanna et al., 2017).



Obrázek 3: Průřez vláknem TNT, který zobrazuje uspořádání jednotlivých aktinových vláken v TNT. Průřez vlákna TNT pořízené kryo-elektronovou tomografií. Na obrázku je patrné šestiúhelníkové uspořádání aktinových vláken v TNT. V pravém horním výřezu je prezentován schematický model. Převzato a upraveno z: Sartori-Rupp et al., 2019.

Výměna materiálu mezi buňkami zprostředkovaná TNT je obousměrná a transportovaný materiál se může v TNT i navzájem míjet při pohybu stejným i opačným směrem (Ganti et al., 2021; He et al., 2010; Önfelt et al., 2006). Přenos přes TNT měl rychlost průměrně 0,05 $\mu\text{m/s}$ a v rovných úsecích se zrychloval (Sartori-Rupp et al., 2019). Rychlost transportovaného nákladu se lišila v závislosti na přenášené látce. Nejpomaleji byly přenášeny mitochondrie, u kterých rychlost transportu dosahovala 5 $\mu\text{m/s}$. Z pozorovaných organel bylo nejrychleji transportované endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex, jejichž rychlost byla až 15,5 $\mu\text{m/s}$. Organely se lišily nejen rychlostí pohybu, ale také vzdáleností, kterou urazily. V tomto případě urazily nejkratší vzdálenost mitochondrie, 25 μm , a nejdelší vzdálenost zase endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex, a to a i přes 75 μm (Wang et al., 2011).

U buněk může docházet během fagocytózy nebo výměny exozomů k výměně buněčných membrán, ale nebylo potvrzeno, že k tomu dochází i pomocí TNT (Omsland et al.,

2018). Při současné kultivaci buněk s fluorescenčně označenými membránami s buňkami s neoznačenými membránami nedošlo k přenesení značených částí membrán na okolní neznačené buňky (Veranič et al., 2008). Tato pozorování byla potvrzena následujícím experimentem, kdy byly spolu kultivovány dvě skupiny buněk, které měly označeny membrány dvěma různými fluorescenčními barvami. I v tomto případě nedocházelo ke smísení membrán ze dvou odlišně obarvených buněk pomocí TNT (Lachambre et al., 2014).

2.2. Buněčné proteiny podílející se na tvorbě TNT

Kromě aktinu a tubulinu je pro vznik TNT potřeba koordinace funkcí několika dalších buněčných proteinů (Hashimoto et al., 2016).

2.2.1. M-Sec

Klíčovým proteinem pro vznik TNT je protein M-Sec. Při delecí genu kódujících tento protein nebo při snížení jeho exprese nebyly buňky schopny tvořit TNT (Hashimoto et al., 2016; Lotfi et al., 2020). Exprese buněčného proteinu M-sec, má vliv nejen na tvorbu TNT ale i na jejich prodlužování k cílové buňce (Hase et al., 2009). Dále ovlivňuje i celkovou buněčnou motilitu. Při snížení jeho exprese došlo u buněk ke zvětšení plochy buněčného povrchu a cirkularizaci buněk (Lotfi et al., 2020). Také se tvořilo pouze malé množství TNT, které bylo asi třetinové v porovnání s kontrolními buňkami. M-Sec je důležitý nejen pro tvorbu TNT, ale také pro jejich funkčnost. Zvýšená exprese M-Sec v buňce měla za následek vznik velkého množství membránových výčnělků na povrchu buňky a TNT, které propojovaly více buněk a tvořily síťovité propojení. Nanotrubice dosahovaly průměrné délky kolem 17,7 μm , ale někdy se mohly prodloužit i až na 40 μm (Obr. 4A) (Hase et al., 2009).

2.2.2. Myosin 10

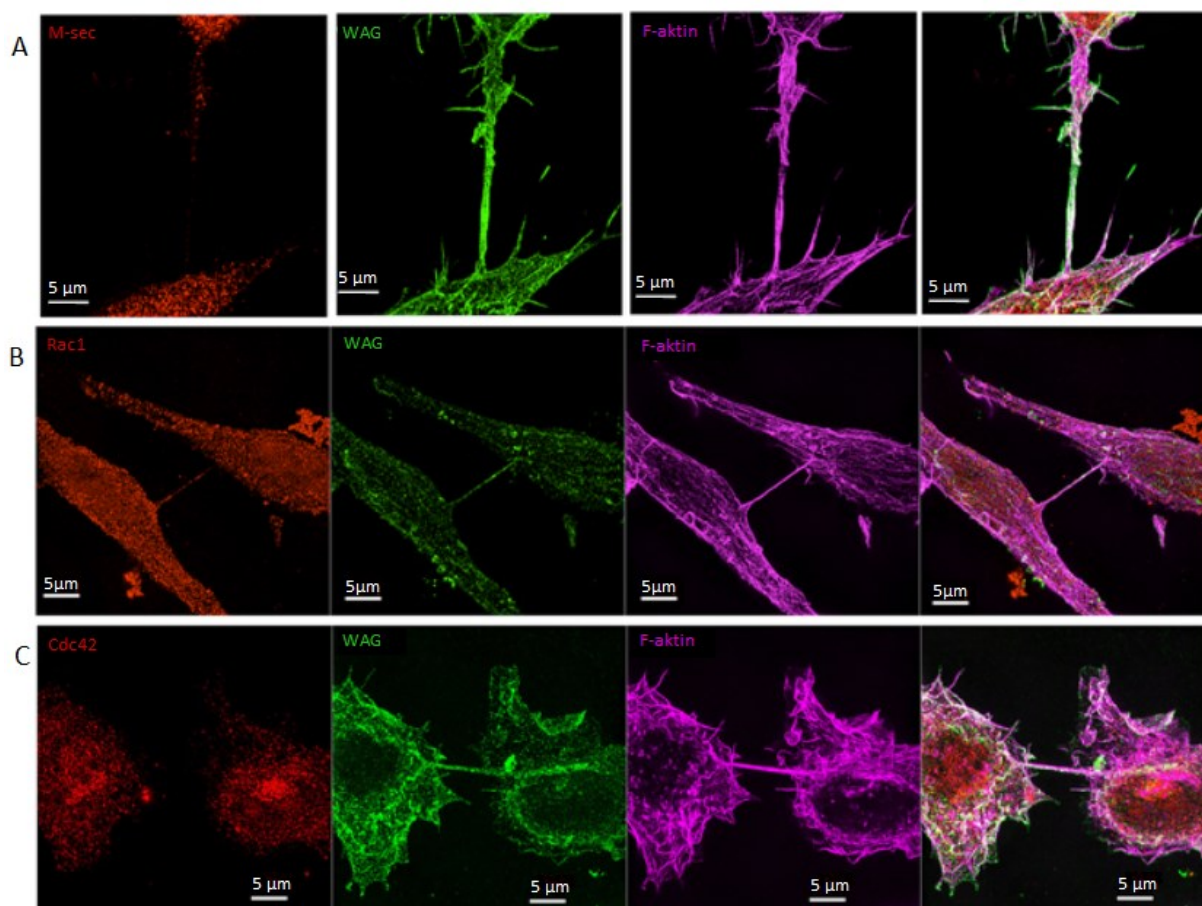
Protein myosin 10 (Myo10) je důležitý pro tvorbu TNT v různých typech buněk. Při jeho zvýšené expresi došlo k výraznému zvýšení počtu TNT mezi buňkami a zároveň i ke zvýšenému množství buněk spojených TNT ve srovnání s kontrolními buňkami. Analogicky, pokud byla exprese Myo10 snížena, došlo také k poklesu tvorby nanotubic (Gousset et al., 2013; Uhl et al., 2019). Z toho lze vyvodit, že protein Myo10 je nezbytný pro tvorbu nanotubic. Avšak i při delecí genu pro Myo10 nedošlo k úplné ztrátě TNT. TNT, které i přes nepřítomnost Myo10 vznikly, byly funkční a dokázaly přenášet vezikuly mezi buňkami. Z toho lze usuzovat, že existují některé nanotrubice, které se mohou tvořit nezávisle na Myo10, a že tento protein není pro tvorbu TNT absolutně nezbytný (Gousset et al., 2013).

2.2.3. RalA

Protein RalA patří mezi malé GTPázy z nadrodiny Ras proteinů (Yan and Theodorescu, 2018). Tento protein byl detekován na plazmatické membráně a membránových výčnělcích (D'Aloia et al., 2018). Pokud byla funkce proteinu v buňkách inhibována zvýšenou expresí nefunkční varianty RalA, tak byla negativně ovlivněna tvorba nanotrubic. Buňky netvořily skoro žádné dlouhé TNT a pouze malý počet krátkých TNT (Hase et al., 2009). Naopak, nadměrná exprese funkčního RalA zvýšila tvorbu a délku mezibuněčných spojů definovaných jako TNT. RalA interaguje s proteinem Sec5, což je protein účastnící se exocytózy a je součástí komplexu zajišťujícího splnutí váčku s cytoplazmatickou membránou. A právě po interakci těchto dvou proteinů došlo k vytvoření TNT. RalA interaguje i s dalšími proteiny důležitými pro vznik TNT jako je LST1 a Cdc42 a Rac1, jejichž aktivitu reguluje (D'Aloia et al., 2018).

2.2.4. Rho GTPázy

Na tvorbu TNT mají vliv i proteiny z rodiny Rho GTPáz - Rac1, Cdc42 a RhoA. Tyto proteiny ale nejsou pro tvorbu TNT úplně nezbytné. Rac1 byl nalezen v TNT, ale Cdc42 se tam vyskytoval minimálně (Obr. 4) (Hanna et al., 2017). Po ošetření buněk inhibitory Rho GTPáz došlo ke ztrátě dlouhých spojů a i ke snížení množství těch kratších (El Najjar et al., 2016). Pokud byl specificky inhibován protein Cdc42, výrazně se snížila tvorba mezibuněčných spojů (Hanna et al., 2017). Hlavně pokleslo množství dlouhých nanotrubic, ale zároveň bylo pozorováno zvýšené množství krátkých spojů. Z toho se dá usoudit, že exprese Cdc42 má vliv na tvorbu dlouhých TNT (Hase et al., 2009). Pokles množství nanotrubic nastal také při inhibici proteinu Rac1 a zároveň došlo i k výraznému snížení jejich stability. Rho GTPázy se tedy pravděpodobně podílejí na regulaci délky a stability TNT.



Obrazek 4: Lokalizace buněčných proteinů M-sec, Rac1, Cdc42 v TNT. Zobrazeny jsou jednotlivé optické řezy. Fluorescenčně byly značeny- buněčné membrány (barvivo WAG- zelená), F-aktin (fialová) a buněčné proteiny M-sec, Rac1 nebo Cdc42 (červená). Na snímcích je patrná lokalizace buněčných proteinů v rámci buňky a TNT. M-sec a Rac1 byly nalezeny v nanotrubicí, zatímco Cdc42 se tam nacházel pouze ve velmi malém množství. Převzato a upraveno z: Hanna et al., 2017.

2.2.5. LST1

LST1 je malý, adaptorový, transmembránový protein specifický pro myeloidní linii leukocytů (Draber et al., 2012). Protein LST1 se nachází v cytoplazmě a na plazmatické membráně (Omsland et al., 2016). Pokud došlo k jeho nadměrné expresi, tak se zvýšilo množství buněk, které tvořily TNT. Tyto nanotrubicce byly delší než u buněk s přirozenou expresí LST1. Mohly dosahovat délky až 200 μm . Zároveň při snížení exprese tohoto proteinu se výrazně snížil i počet nanotrubic mezi buňkami. Protein LST1 interaguje s proteinem M-Sec a zároveň je pro tvorbu TNT indukovanou proteinem LST1 důležitý protein RalA (Schiller et al., 2013).

2.2.6. Proteiny z rodiny Rab GTPáz

Tvorbu TNT ovlivňují také proteiny Rab8a, Rab11a a Rab35. Při nadměrné expresi každého proteinu došlo ke zvýšení množství TNT a tím i ke zvýšení transportu vezikul (Bhat et al., 2020;

Zhu et al., 2018). Zároveň v případě Rab11a došlo také k jeho přenosu mezi buňkami prostřednictvím TNT (Zhu et al., 2018).

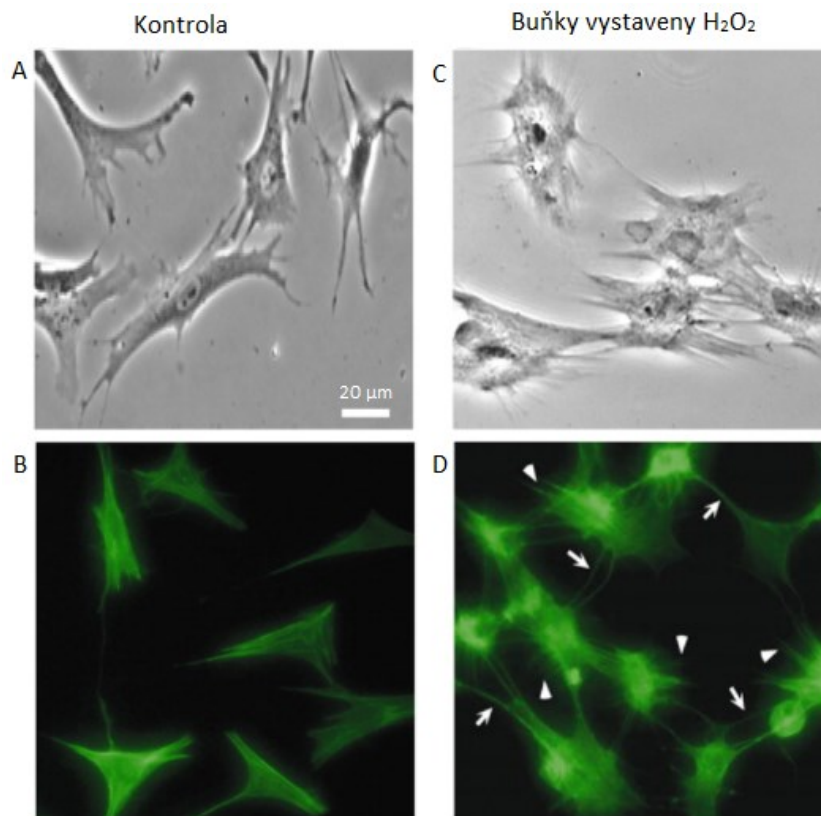
2.2.7. Proteiny spojené s apoptózou

Dále byly v souvislosti s tvorbou TNT zkoumány proteiny p53, Bax a kaspázy, které jsou zapojeny v dráze programované buněčné smrti. Při nadměrné expresi p53 došlo ke zvýšené tvorbě TNT, a naopak u buněk exprimujících mutantní p53 došlo k blokaci jejich vzniku. Zatím co při inaktivaci proteinu Bax a kaspáz nedošlo ke změně efektivity tvorby TNT, což naznačuje, že další proteiny apoptotické dráhy nehrají roli ve vzniku TNT. Protein p53 má pravděpodobně vliv na expresi proteinu M-Sec, hlavního regulátoru vzniku TNT. Při vystavení buněk stresu způsobeného H₂O₂ došlo k aktivaci p53 a zvýšené expresi M-Sec (Wang et al., 2011). Avšak u buněk PC12 vliv proteinu p53 na tvorbu TNT prokázán nebyl. To naznačuje, že se protein p53 může účastnit tvorby TNT, ale není pro jejich vznik nezbytný (Andresen et al., 2013). Dále bylo za použití inhibitorů zkoumáno, jestli proteinkinázy Akt, PI3K a mTOR (také zapojeny v regulaci apoptózy) nemají vliv na vznik TNT. Ukázalo, že všechny tři kinázy jsou důležité pro vznik TNT. Při nadprodukci nefunkčního mutanta proteinu Akt došlo k blokaci vzniku nanotubic. Pokud byly buňky kultivovány s inhibitorem PI3K, snížilo se množství vzniklých TNT. Ke stejnému výsledku došlo i po přidání inhibitorů proteinu mTOR (Wang et al., 2011).

2.3. Biologická funkce TNT

TNT slouží ke komunikaci buněk mezi sebou, buňky si mohou vzájemně předávat různý materiál, od proteinů po organely jako jsou mitochondrie. Ale hlavní funkcí TNT je reakce na buněčný stres. Při vystavení buněk PC12 (buňky feochromocytomu potkanů) stresu v podobě UV záření a následné kultivaci s inhibitorem polymerace aktinu bylo detekováno více mrtvých buněk než v případě, kdy byly buňky vystavené stresu kultivovány bez inhibitoru polymerace aktinu. Z toho lze usuzovat, že TNT hrají roli při záchraně buněk před buněčnou smrtí indukovanou stresem (Wang and Gerdes, 2015). Zvýšená tvorba TNT byla pozorována i u buněk vystavených i jiným stresovým podmínkám. Pokud byly buňky vystaveny stresujícím faktorům jako jsou hladovění, kyselé prostředí nebo hypoxie, které jsou charakteristické pro rakovinné bujení, tak byla pozorována zvýšená frekvence vzniku TNT mezi buňkami. Vzniklé nanotrubice se častěji tvořily mezi stresovanými a nestresovanými buňkami, než mezi buď pouze stresovanými nebo pouze nestresovanými. Pokud byly stresované buňky vystaveny inhibitoru polymerace aktinu nebo byla tvorba TNT narušena mechanicky (třesením), došlo ke zvýšení buněčné smrti (Kretschmer et al., 2019). Při vystavení buněk H₂O₂ došlo k reorganizaci F-aktinu a zvýšení tvorby TNT (Obr. 5) (Zhu et al., 2005). Zvýšenou tvorbu

TNT indukovala i hypoxie nebo snížená koncentrace séra v kultivačním médiu (Desir et al., 2016; Zhu et al., 2016). U Schwanových buněk kultivovaných v médiu se sníženou koncentrací séra byla detekována zvýšená exprese malých GTPáz Rab8a a Rab11a, které se podílí na tvorbě TNT. Pokud došlo k výraznému snížení exprese těchto GTPáz u stresovaných buněk, došlo i k razantnímu poklesu počtu TNT. Z toho lze usuzovat, že Rab8a a Rab11a jsou nutné k tvorbě TNT a k reakci buněk na stresové podmínky (Zhu et al., 2016).



Obrázek 5: Zobrazení zvýšené tvorby TNT u buněk astrocytů vystavených stresu v podobě H₂O₂. Ukázány jsou vybrané optické řezy. Fluorescenčně značen- F-aktin (zelená) (B, D). Buňky astrocytů byly vystaveny H₂O₂, což zapříčinilo zvýšený vznik TNT (C, D) v porovnání s kontrolními buňkami (A, B). Převzato a upraveno z: Zhu et al., 2005.

V reakci buněk na stres hraje patrně roli transport mitochondrií mezi buňkami. Mitochondrie mohou být transportovány pomocí TNT, což může buňku se špatně fungujícími mitochondriemi uchránit před apoptózou (Yang et al., 2022). Aby se dokázalo, že se jedná o přenos mitochondrií mezi buňkami prostřednictvím TNT, byly buňky inkubovány v médiu s inhibítorem polymerace aktinu, CytochalasinemB. Tato látka inhibuje tvorbu i přenos mitochondrií pomocí TNT, k čemuž také u pozorovaných buněk došlo (Bukoreshtliev et al., 2009; Jackson et al., 2016). Zároveň bylo prokázáno, že dochází k transportu funkčních mitochondrií. V akceptorových buňkách došlo k výraznému zvýšení respirace i obrátu ATP (Jackson et al., 2016).

Zvýšená tvorba TNT byla pozorována i u nádorových buněk. Nádorové prostředí je často kyselé, což stimuluje tvorbu TNT. Při pozorování buněk, kultivovaných 72 hodin v kyselém médiu, byla časověnou konfokální mikroskopií pozorována zvýšená tvorba TNT (Lou et al., 2012). Těmito nanotrubicemi se zároveň mohly transportovat mitochondrie do rakovinných buněk (Saha et al., 2022).

Kromě vyrovnávání se buněk se stresem hrají TNT roli i v patogenezi neurodegenerativních onemocnění a prionových infekcích. Při neurodegenerativních onemocněních bylo pozorováno zvýšené množství TNT, kterými se mohou šířit proteiny typické pro dané patologie a tím je i zhoršovat. Při vystavení buněk proteinu $\text{oA}\beta$, který je typický pro Alzheimerovu chorobu, došlo ke zvýšení tvorby TNT, kterými se pak $\text{oA}\beta$ mohl šířit na další buňky (Dilna et al., 2021). Analogický proces byl pozorován i při Parkinsonově chorobě, pro kterou je důležitý protein $\alpha\text{-SYN}$. Ten indukoval tvorbu TNT a byl jimi i přenášen (Rostami et al., 2017).

Transport pomocí TNT je jedním z mechanismů, kterými se mohou rozšiřovat i priony a tím zhoršovat dané onemocnění (Abounit et al., 2016). Priony byly nalezeny uvnitř TNT ale i na jejich povrchu. Z toho lze usuzovat, že priony se mohou mezi buňkami šířit pomocí TNT (Gousset et al., 2009). Zároveň se ukázalo, že extracelulární druhy Tau proteinu, jako jsou monomery a fibrily, indukují tvorbu TNT, které také slouží k jejich přenosu mezi neurony (Abounit et al., 2016; Tardivel et al., 2016). Tau protein byl detekován také uvnitř TNT, kde se může navázat na aktin, avšak samotná exprese Tau proteinu k indukci vzniku nanotrubic nestačí (Tardivel et al., 2016).

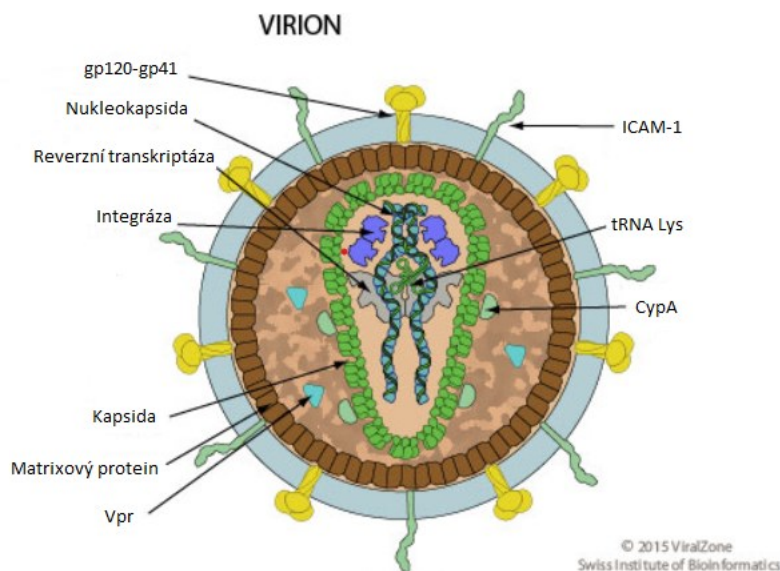
3. Role tunneling nanotubes v přenosu virů z buňky do buňky

3.2. Retroviry

3.2.1. Virus lidské imunodeficiency (HIV-1)

Virus HIV-1 se vyskytuje celosvětově a je původcem onemocnění získané imunodeficiency (AIDS). Jedná se o patogen, který se v lidské populaci ustálil ve dvacátém století. Jde o zoonózu, která se na člověka přenesla v Africe ze šimpanze (shrnutí z: Ferguson et al., 2002). Současnou antivirovou terapií lze infekci kontrolovat, ale zatím neexistuje žádná léčba, která by pacienta definitivně vyléčila (shrnutí z: Henderson et al., 2020).

HIV-1 se řadí se do rodu *Lentivirus* z čeledi *Retroviridae*. Virion je veliký přibližně 100 nm a má kulovitý tvar (Obr.6). Virový genom je tvořen dvěma kopiemi jednořetězcové RNA o velikosti 9 kb. Virion HIV-1 je obalen lipidovým obalem, který obsahuje obalové glykoproteiny – protein gp120 a gp41. Glykoprotein gp120 slouží k navázání na buněčný povrch, zatímco gp41 zprostředkovává fúzi s membránou hostitelské buňky. Pod lipidickým obalem se nachází vrstva matrixového proteinu. Uvnitř virionu se nachází nukleokapsida, která se skládá z kapsidového proteinu p24 a virového genomu, který je obalen nukleoproteinem a interagují s ním i důležité virové enzymy integráza, reverzní transkriptáza a virová proteáza. (shrnutí z: Ferguson et al., 2002).

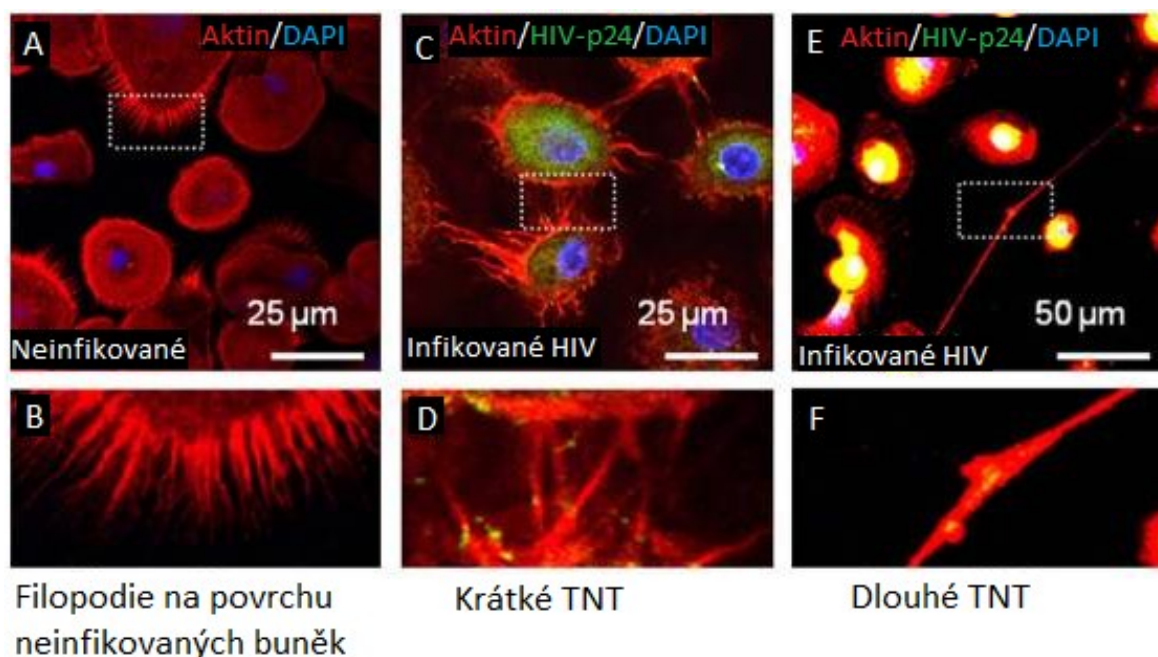


Obrázek 6: Schéma virionu HIV-1 Převzato a upraveno z webové stránky ViralZone (“Human immunodeficiency virus 1 ~ ViralZone,” n.d.).

Virový protein gp120 interaguje s buněčným receptorem CD4, který se nachází na povrchu pomocných T-lymfocytů a dalších buněk imunitního systému. Tato interakce zapříčiní změnu konformace gp120 a jeho následnou interakci s chemokinovými koreceptory. Poté dojde k fúzi virového obalu a buněčné membrány a uvolnění nukleokapsidy do cytoplazmy. V cytosolu dojde pomocí reverzní transkriptázy k přepisu jednoho

genomového vlákna RNA procesem reverzní transkripce do DNA (shrnuto z: Ferguson et al., 2002). V jádře hostitelské buňky pak dojde k integraci virové DNA virovou integrázou do hostitelského chromozomu (shrnuto z: Ferguson et al., 2002; Kleinpeter and Freed, 2020). Integrovaná virová DNA, označovaná jako provirus, je dále transkribována a ze vzniklých mRNA jsou translatovány virové proteiny. Po syntetizování dostatečného množství virových proteinů a genomových RNA dochází k morfogenezi virionu pod cytoplazmatickou membránou, jejich pučení a závěrečné maturaci. Takto formované viriony jsou schopny infikovat další buňky a zabezpečit šíření viru v organismu (shrnuto z: Ferguson et al., 2002).

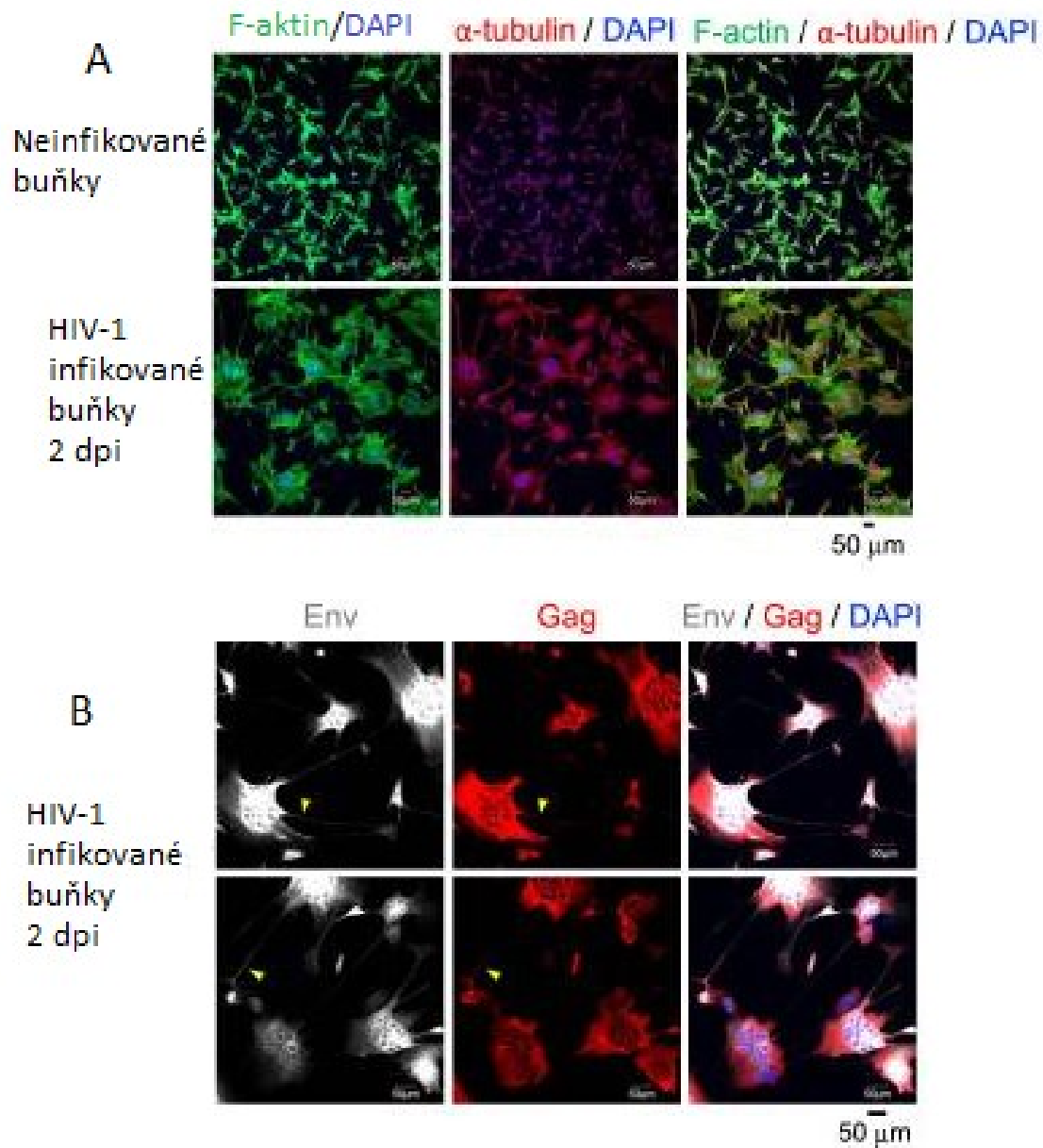
Kromě „klasického“ způsobu přenosu viru z buňky do buňky může využívat virus HIV-1 i alternativní cesty. Pro odhalení, jestli může HIV-1 využívat k transportu TNT byl studován přenos viru v lidských monocytech a T-lymfocytech (Eugenin et al., 2009; Sowinski et al., 2008). Při společné kultivaci infikovaných buněk s neinfikovanými bylo možné detekovat značené virové polyproteiny Env (prekurzor obalových glykoproteinů) nebo Gag (prekurzor matrixového, kapsidového a nukleokapsidového proteinu) na mezibuněčných spojích mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami (Obr. 7B). S postupujícím časem bylo možné tyto proteiny nalézt i v předtím neinfikovaných buňkách. Zároveň bylo zjištěno, že polyprotein Gag se pohybuje skrz nanotrubicí směrem k neinfikovaným buňkám průměrnou rychlostí 0,08 $\mu\text{m/s}$ (Sowinski et al., 2008). Není však jisté, jestli se pomocí TNT přenáší do dalších buněk celý HIV-1 virion nebo pouze virové proteiny (Okafo et al., 2017).



Obrázek 7: Přenos virových proteinů z infikovaných do neinfikovaných buněk. Ukázány jsou vybrané optické řezy makrofágů infikovaných a neinfikovaných virem HIV-1. Imunofluorescenčně barven virový protein p24 (zeleně), aktin (červeně) a DNA(DAPI- modrá). A, B- Neinfikované buňky na jejichž povrchu se nacházejí filopodie. C, D- Infikované makrofágy 3 dny po infekci virem HIV-1, které tvoří krátké TNT nebo dlouhé TNT (E, F). Převzato a upraveno z: Eugenin et al., 2009.

I když nebylo doposud jasně prokázáno, že dochází k přenosu virionu HIV-1 prostřednictvím TNT, bylo publikováno několik studií, které význam TNT ve virové infekci podporují. Infekce virem HIV-1 má vliv na tvorbu TNT, který ale závisí na buněčném typu. Zatímco u infikovaných T-lymfocytů se vytvářel přibližně stejný počet TNT jako u neinfikovaných, tak u makrofágů způsobila infekce virem HIV-1 dočasné zvýšení jejich počtu mezi buňkami (Eugenin et al., 2009; Sowinski et al., 2008). Ke zvýšení počtu TNT u makrofágů došlo v časných fázích infekce, kdy docházelo i k největší replikaci viru, což bylo 1-3 dny po infekci (Eugenin et al., 2009; Hashimoto et al., 2016). Největší nárůst počtu byl u krátkých nanotrubiček, dlouhých průměrně 30 μm, a to až o 70 %. Zatímco počet dlouhých TNT, které dosahovaly průměrné délky 150 μm, se zvýšil jen o 25 % (Obr. 8) (Eugenin et al., 2009). Množství vytvořených TNT, záviselo také na množství infikovaných buněk. V době, kdy jich byla infikována nadpoloviční většina, došlo ke snížení tvorby TNT a také snížení jejich stability (Okafo et al., 2017). S postupující infekcí kleslo množství mezibuněčných spojů, až dokud nedosáhlo podobného počtu jako u neinfikovaných makrofágů, k čemuž došlo 8 dní po infekci. Tato data naznačují, že na zvýšení tvorby TNT může mít vliv replikace viru. Vzniklé TNT byly u infikovaných buněk delší, tlustší a vytvořilo se jich více než u neinfikovaných buněk. Obsahovaly také α-tubulin a virové proteiny Env a Gag (Obr. 8), což potvrzuje domněnku, že

v infikovaných buňkách dochází k indukci tvorby TNT pro zvýšení efektivity infekce dalších buněk (Eugenin et al., 2009; Lotfi et al., 2020).



Obrázek 8: Zvýšení tvorby TNT po infekci virem HIV-1. Ukázány jsou vybrané optické řezy neinfikovaných a HIV-1 infikovaných lidských gliomových buněk 2 dny po infekci (dpi). A - Imunofluorescenčně barvený F-aktin (zelená), α -tubulin (červená), DNA (DAPI- modrá). V TNT byl detekován F-aktin a α -tubulin. B- Barveno pomocí specifických protilátek proti virovým proteinům Env (šedá), Gag (červená) a DNA (DAPI - modrá). Žluté šipky označují přítomnost TNT, ve kterých lze pozorovat značené virové proteiny. Převzato a upraveno z: Lotfi et al., 2020.

Na infekci způsobenou virem HIV-1 má zásadní vliv virový protein Nef. Protein má vliv nejen na virovou replikaci, ale i na tvorbu TNT. U buněk infikovaných virem HIV-1, který byl Nef deficientní, se TNT tvořily jen vzácně (Hashimoto et al., 2016). To je způsobeno tím,

že míra exprese Nef proteinu ovlivňuje expresi buněčného proteinu Myo10, jehož množství má vliv na tvorbu TNT (Uhl et al., 2019). Celkově exprese Nef proteinu ovlivňuje nejen množství vzniklých TNT ale i jejich strukturu. U buněk infikovaných virem HIV-1 byly vzniklé nanotrubicice silnější a vyskytovaly se s vyšší frekvencí, případně se i větvily, než u buněk, které byly infikovány virem s delecí kódující sekvence pro protein Nef (Mukerji et al., 2012).

Virový protein Nef může být pomocí TNT i transportován do dalších buněk. Po společné kultivaci buněk, které exprimovaly fluorescenčně značený protein Nef, s buňkami tento protein neexprimujícími byl protein Nef detekován, i v buňkách, které ho původně neprodukovaly (Uhl et al., 2019). Dále byla ukázána schopnost TNT přenášet Nef protein do T-buněk. Protein Nef snižuje množství koreceptoru CD4 na buněčném povrchu (Garcia and Miller, 1991; Uhl et al., 2019). Proto jako akceptorové buňky sloužily takové, které na svém povrchu exprimovaly velké množství CD4 molekul. Po kultivaci těchto buněk s infikovanými makrofágy došlo k poklesu množství CD4 na povrchu buněk, což dokládá úspěšné přenesení proteinu Nef mezi buňkami (Uhl et al., 2019).

Protein Nef se může pomocí TNT přenášet i do B-lymfocytů. Pro tvorbu TNT B-lymfocyty bylo potřeba ATP a polymerace aktinu. Po přidání inhibitorů polymerace aktinu se snížilo množství nových TNT mezi buňkami, zatímco po přidání inhibitorů polymerace tubulinu, nedošlo inhibici tvorby nových TNT (Xu et al., 2009). Nef má zásadní vliv na tvorbu protilátek u infikovaných B-lymfocytů, kde inhibuje vznik některých jejich tříd. Infikované B-lymfocyty vytvářejí méně IgG a IgA, pravděpodobně z důvodu, že se B buňky stávají méně citlivé na signály ohledně přepínání tříd od pomocných T-lymfocytů. Přenesený Nef protein může tedy negativně ovlivňovat funkci B-lymfocytu (Xu et al., 2009).

Kromě virem kódovaných proteinů hrají roli v přenosu proteinů HIV-1 prostřednictvím TNT také buněčné proteiny. M-Sec ovlivňuje expresi virových proteinů, také se podílí na jejich přenosu mezi buňkami (Hashimoto et al., 2016; Lotfi et al., 2020). Jeho exprese vedla ke zvýšení množství Gag proteinu (Hashimoto et al., 2016). Pokud dojde k jeho knockdownu, klesne jak množství virového Env proteinu, tak i exprese proteinu Gag bude také snižena (Lotfi et al., 2020). V kulturách infikovaných HIV-1 bylo detekováno větší množství M-Sec než v neinfikovaných. Tyto buňky následně pak vytvářely množství jak tenkých tak tlustých TNT mezi makrofágy (Hashimoto et al., 2016). M-Sec tak pravděpodobně usnadňuje a urychluje přenos HIV-1 proteinů mezi buňkami s pomocí zvýšené tvorby TNT (Hashimoto et al., 2016; Lotfi et al., 2020).

Na infekci virem HIV-1 může mít vliv i přítomnost dalšího patogenu. Příkladem je bakterie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), která po infekci buněk způsobí až 2krát větší

zvýšení tvorby TNT. Při současné infekci oběma patogeny došlo k ještě větší tvorbě mezibuněčných spojů. Tyto TNT obsahovaly virové proteiny i samotné viriony. Mtb napomáhá pouze k lepšímu šíření viru mezi buňkami. Zvýšenou tvorbu nanotrubic způsobuje cytokin IL10, který je produkován následkem infekce Mtb (Souriant et al., 2019). Dalším proteinem, který má důležitou roli pro šíření HIV při koinfekci s Mtb je lektinový receptor Siglec-1, který byl nalezen na mikrotubulech. Tyto TNT byly tlustší, dosahovaly i větší vzdálenosti, déle vydržely a virus HIV-1 se nacházel hlavně v nich. Pokud byla snížena transkripce genu pro Siglec-1, nezměnilo se množství tlustých TNT, ale došlo k jejich výraznému zkrácení (Dupont et al., 2020).

3.2.2. Virus lidské T-buněčné leukemie typu 1 (HTLV-1)

Dalším virem z čeledi *Retroviridae*, u kterého byl ukázán přenos virem kódovaných proteinů pomocí TNT, je virus lidské T-buněčné leukemie typu 1 (HTLV-1). HTLV-1 se řadí do rodu *Deltarertovirus* a je to první identifikovaný retrovirus napadající člověka, který byl izolován v roce 1980 z T-lymfocytů. Infikuje hlavně CD4 pozitivní pomocné T-lymfocyty. Způsobuje T-buněčnou leukemii, myelopatii nebo také oční onemocnění (shrnuto z: Kamoji, 2020). Stavba virionu a průběh replikačního cyklu je analogický s HIV-1.

U buněk T-lymfocytů infikovaných virem HTLV-1 byly nalezeny mezibuněčné spoje, které byly identifikovány jako TNT (Van Prooyen et al., 2010). Nanotrubičky byly složeny z aktinu a neobsahovaly tubulin, dosahovaly délky až 5 μm a neinteragovaly se substrátem (Omsland et al., 2018). Pomocí těchto mezibuněčných spojů dochází k transportu virionů do neinfikovaných buněk, a tím dochází ke snadnému šíření viru (Van Prooyen et al., 2010). Pomocí TNT mohou být transportovány i virové proteiny Tax (transaktivátor virových i buněčných genů) a Gag (prekurzor strukturních proteinů), které byly nalezeny v TNT (Omsland et al., 2018). Navíc bylo ukázáno, že Tax protein je pravděpodobně důležitý pro tvorbu TNT v infikovaných buňkách, protože zvyšuje expresi M-Sec proteinu, který indukuje tvorbu TNT (Hase et al., 2009; Omsland et al., 2018).

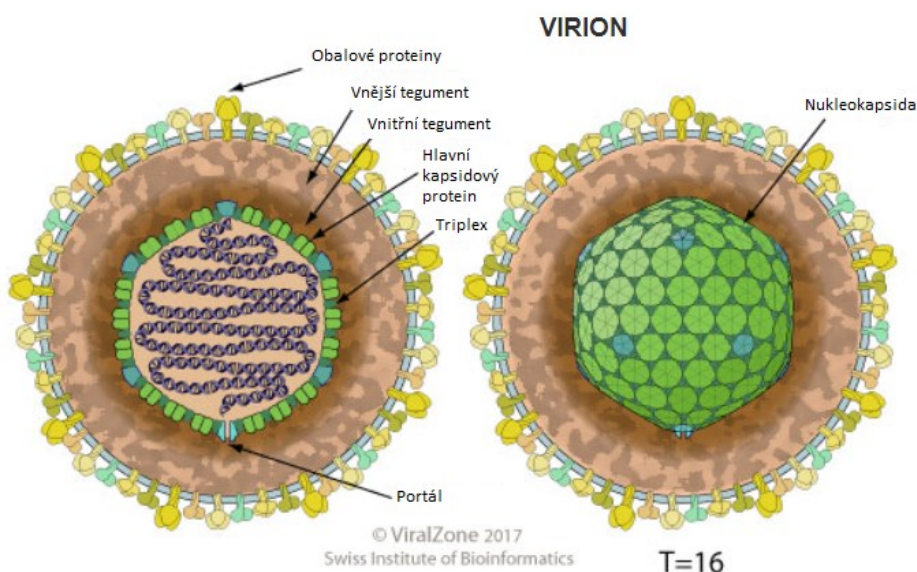
Dalším virovým proteinem, který významně podporuje tvorbu a délku nanotrubic je p8 (pomocný protein, který pomáhá se vyhnout imunitnímu systému). Při expresi p8 v T-buňkách došlo k výraznému zvýšení počtu TNT na jednu buňku i celkovému zvýšení počtu buněk tvořících TNT. Došlo také k prodloužení těchto mezibuněčných spojů. Při porovnání s buňkami infikovanými modifikovaným HTLV-1, který nemohl exprimovat p8, se zjistilo, že tyto buňky vytvářejí méně TNT. Z toho vyplývá, že protein p8 podporuje tvorbu TNT, a tím i pomáhá šířit virus mezi buňkami (Van Prooyen et al., 2010).

3.3. Herpesviry

Viry z čeledi *Herpesviridae* způsobují řadu onemocnění lidí a zvířat. Mezi lidské patogeny se řadí například herpes simplex virus 1, varicella zoster, lidský cytomegalovirus, virus Epstein-Barrové, virus Kaposiho sarkomu a další. Herpesvirové infekce jsou celoživotní, protože dochází k jejich latenci v hostitelích (shrnutí z: Connolly et al., 2021).

Genomem herpesvirů je lineární, dvouřetězcová DNA molekula. Na povrchu virionu se nachází lipidický obal obsahující velké množství virem kódovaných glykoproteinů. Pod obalem se nachází tegument, což je amorfni vrstva, ve které se vyskytují virové proteiny. Uvnitř virionu je nachází kapsida, která obaluje virový genom (Obr. 9) (shrnutí z: Kukhanova et al., 2014).

Obrázek 9: Schéma virionu herpesviridae. Převzato a upraveno z webové stránky ViralZone (“Herpesviridae ~ ViralZone,” n.d.).



Virion se prostřednictvím povrchového glykoproteinu gD naváže na příslušné receptory na hostitelské buňce, což přenese signál na dimer glykoproteinů gH-gL. Poté dojde ke změně konformace glykoproteinů gH a gL, a signalizaci k fúzi, která proběhne díky změně konformace glykoproteinu gB, což zapříčiní vstup viru do buňky. (shrnutí z: Connolly et al., 2021). Uvolněná virová kapsida je transportována podél mikrotubulů k jádru, do kterého vstupuje pouze virová DNA, která okamžitě po vstupu do jádra cirkularizuje. V jádře dojde buď k útlumu transkripce a ustanovení latentní fáze nebo dojde k ustanovení lytické infekce a zahájení transkripce bezprostředně časných genů. Dále následuje transkripce časných genů, jejichž produkty jsou nezbytné pro syntézu virové DNA. Následně se replikuje virová DNA a syntetizují pozdní geny. Nakonec dojde k morfogenezi virionu a jeho vypuštění z buňky (shrnutí z: Packard and Dembowski, 2021).

Mezi modelové viry, u kterých byla zkoumána možnost přenosu prostřednictvím TNT patří bovinní herpesvirus 1 (BoHV-1) a Pseudorabies virus (PRV). U těchto virů bylo pozorováno šíření viru pomocí TNT na jiné buňky (Favoreel et al., 2005; Panasiuk et al., 2018).

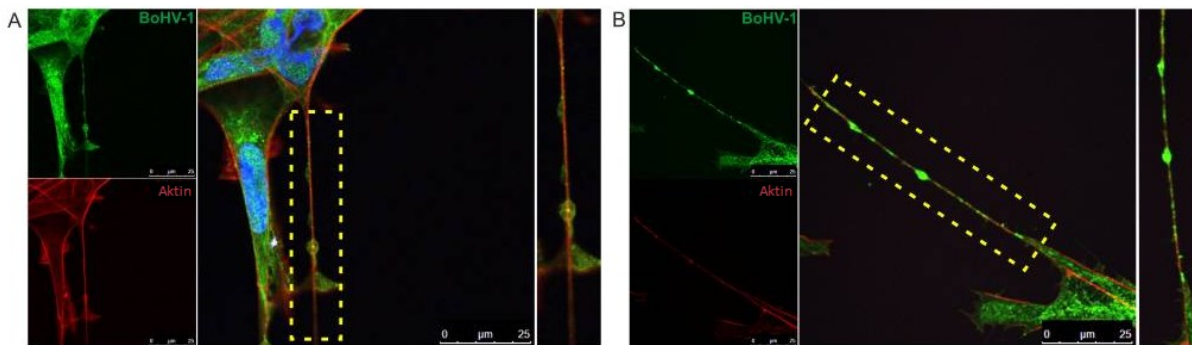
Při kultivaci buněčných kultur infikovaných BoHV-1 byly pozorovány různě dlouhé nanotrubicce. Krátké byly tvořeny aktinovými vlákny a většina dlouhých spojů navíc obsahovala i mikrotubuly. Delší spoje byly na základě morfologie definovány jako TNT. Jednalo se o křehké, tenké aktinové nanotrubicce, které někdy obsahovaly i tubulin a nebyly připojeny k substrátu. V kulturách infikovaných BoHV-1 se vytvářela síť mezibuněčných spojů propojujících více buněk, která obsahovala větší počet dlouhých nanotrubic v porovnání s kulturou neinfikovaných buněk. Virová infekce měla vliv i na množství vzniklých TNT, došlo k zvýšení počtu dlouhých TNT. Na délku a tvorbu TNT měl vliv i typ infikované tkáně, kde u fibroblastů bylo množství TNT vyšší než u buněk nosohltanu. U infikovaných buněk nosohltanu došlo k prodloužení TNT o 40%, zatím co u fibroblastů až o 70% (Panasiuk et al., 2018).

Pro zvýšení tvorby TNT v infikovaných buňkách je důležitá virová serin/threonin protein kináza Us3. Po infekci buněk virem PRV došlo k vytvoření dlouhých aktinových mezibuněčných spojení, které se však v nepřítomnosti virového proteinu Us3 netvořily. Z tohoto důvodu se usuzuje, že protein Us3 je důležitý pro tvorbu TNT. K tvorbě nanotrubic není potřeba dalších virových proteinů, protože se tvořily i v případě, že byl protein Us3 individuálně exprimovaný v buňkách (Favoreel et al., 2005; Jansens et al., 2017). Tyto TNT indukované Us3 byly velmi stabilní, pravděpodobně protože v místě kontaktu obsahovaly adhezivní molekuly E-kadherin a β -katenin. Dále obsahovaly tubulin, jehož posttranslační modifikace (acetylace a detyrosinace) podporovaly jeho stabilitu (Jansens et al., 2017).

Pro ověření možnosti přenosu proteinů nanotrubicemi byly použity mutantní BoHV-1 s fluorescenčně značenými proteiny E, VP26 a Us3. První protein E byl glykoprotein, který je složkou virového obalu, druhým byl kapsidový protein VP26 a třetím značeným proteinem byl tegumentový protein serin-threoninkináza Us3. Všechny zkoumané virové proteiny byly přenášeny TNT. Proteiny byly detekovány jak uvnitř buněk tak na povrchu TNT, a zároveň uvnitř TNT byly pozorovány granule jednotlivých proteinů (Panasiuk et al., 2018). Při zkoumání pohybu proteinu VP26 v nanotrubicích, se zjistilo, že se protein pohybuje velice rychle směrem ke špičce, kolem 0,29 $\mu\text{m/s}$ a v některých případech bylo možné pozorovat i krátký pohyb opačným směrem (Favoreel et al., 2005; Panasiuk et al., 2018).

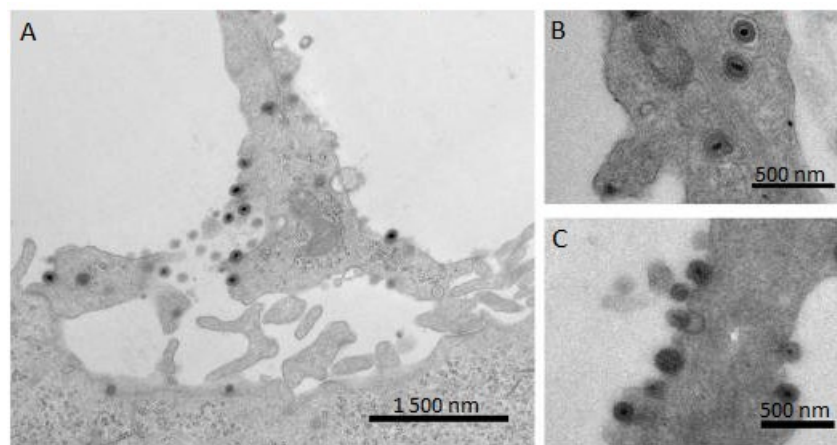
Aby se prokázalo, že došlo k šíření celých virionů těmito strukturami, byly infikované buňky inkubovány v prostředí, které obsahovalo protilátky proti PRV. Po 7 hpi bylo možné detekovat virové nukleokapsidy v buňkách, které předtím nebyly infikované (Obr. 10) (Favoreel et al., 2005). Dále byl sledován přenos viru BoHV-1 pomocí TNT nejenom mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami stejného typu, ale i mezi buňkami různých typů.

K přenosu virů pomocí nanotrubic došlo z infikovaných buněk nosohltanu nejenom do neinfikovaných buněk stejného typu ale i do fibroblastů (Panasiuk et al., 2018).



Obrázek 10: Přenos BoHV-1 prostřednictvím TNT mezi buňkami. Ukázány jsou jednotlivé optické řezy. Infikovány byly buňky nosohltanu (A) a bovinní fibroblasty (B). Fluorescencně značeno– BoHV-1 (detekce pomocí séra anti-BoHV-1- zelená), F-aktin (červená), jádra (modrá). Na snímcích je vidět přenos BoHV-1 pomocí TNT v obou typech buněk. Převzato a upraveno z: Panasiuk et al., 2018.

Herpesviry jsou skrz TNT transportovány obalené. Tento primární obal získávají z vnitrobuněčných membrán a k plazmatické membráně jsou transportovány ve vezikulech, proto se i v TNT nacházejí ve vezikulech. To má za následek, že se virus může po celé délce nanotrubice exocytovat a vzniklé vezikuly následně fúzíjí s plazmatickou membránou akceptorové buňky (Obr. 11) (Jansens et al., 2017). Tento způsob přenosu částečně zprostředkovaný pomocí TNT je velice unikátní a zatím byl popsán pouze u viru PRV, proto není jisté, jestli se takto přenášejí všechny Herpesviry.

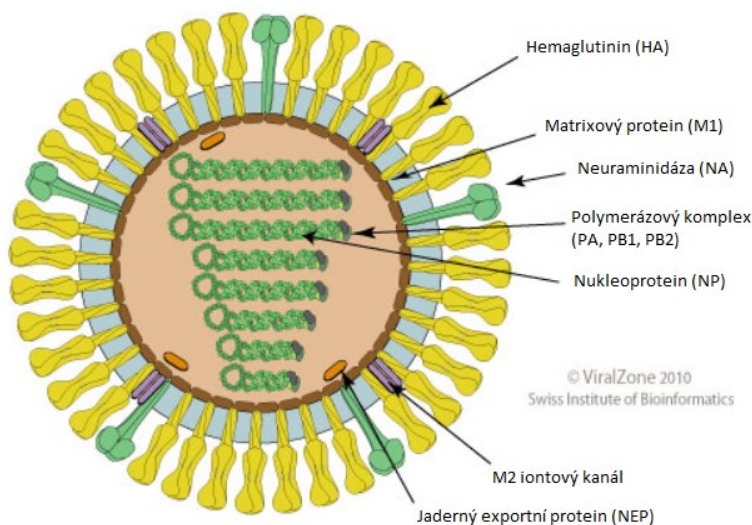


Obrázek 11: Přenos a pučení PRV mezi buňkami pomocí TNT. Jedná se o snímky pořízené transmisíí elektronovou mikroskopií. Infikovány byly buňky prasečích varlat. A– Místo kontaktu TNT, vzniklého indukci virového proteinu Us3, s akceptorovou buňkou. B a C– Transport jednotlivých obalených virů skrz TNT, které mohou po celé délce TNT vypučet a následně se navázat na akceptorovou buňku, s jejíž plazmatickou membránou fúzíjí. Převzato a upraveno z: Jansens et al., 2017.

3.4. Virus chřipky

Virus chřipky z čeledi *Orthomyxoviridae* způsobuje akutní respirační onemocnění označované jako chřipka. Jedná se o obalený virus se segmentovaným -ssRNA genomem. Pod lipidovým obalem s virovými glykoproteiny hemaglutinin (HA), neuraminidáza (NA) a iontovými kanály (M2) se nachází vrstva matrixového proteinu. Ve virionu se nachází 6-8 segmentů virové RNA obalených nukleokapsidovým proteinem. S každým segmentem asociuje komplex virových proteinů, jedním z nich je virová RNA polymeráza (Obr. 12) (shrnutí z: Luo, 2011).

VIRION

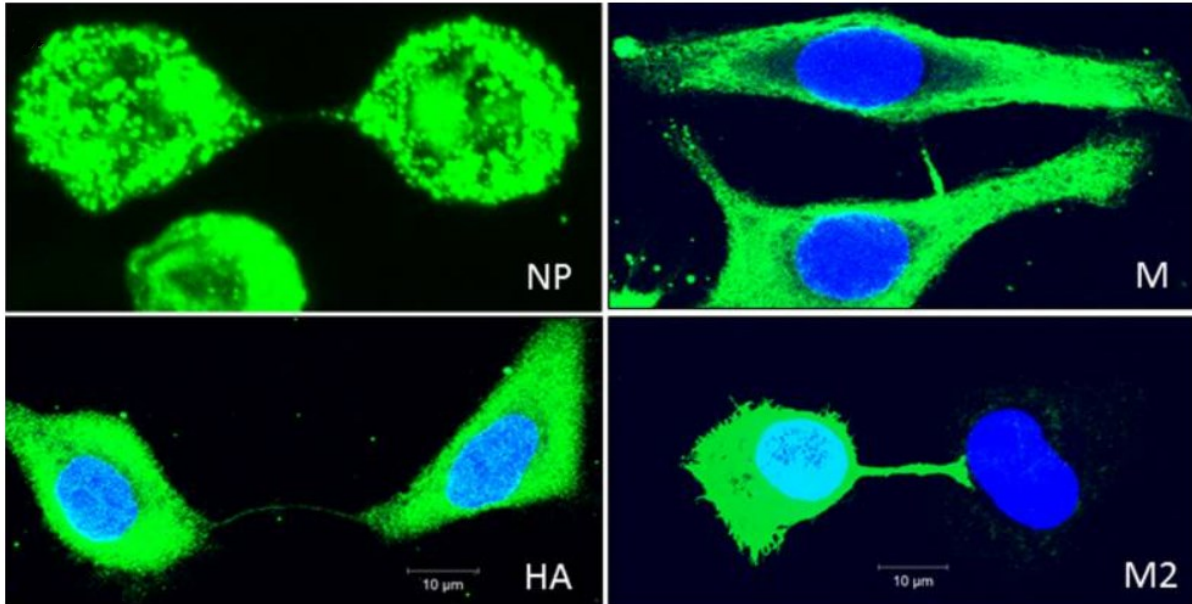


Obrázek 12: Schéma chřipkového virionu. Převzato a upraveno z webové stránky ViralZone (“H1N1 subtype ~ ViralZone,” n.d.).

Vstup viru do buňky je zprostředkován virovým proteinem hemaglutininem. Virion chřipky se naváže hemaglutininem na specifický receptor hostitelské buňky s kyselinu sialovou a po vzájemné interakci dojde k endocytóze viru. Díky snižujícímu se pH v časném endozomu dojde k fúzi membrány viru a endozomu a uvolnění kapsidy z endozomu (shrnutí z: Luo, 2011). Dále jsou virové nukleokapsidy transportovány do jádra, kde jsou replikovány a transkribovány virovou RNA polymerázou. Po nasyntetizování dostatečného množství virových strukturních proteinů a genomových RNA dojde v jádře k morfogenezi nukleokapsid. Ty jsou poté transportovány k plazmatické membráně obsahující virové glykoproteiny HA, NA a M2 proteiny, kde dojde k finální morfogenezi virionu a jeho vypuštění ven z buňky. (shrnutí z: Pleschka, 2013).

Pro objasnění, jestli je virus chřipky mezi buňkami transportován TNT, byly použity epiteliální buňky s fluorescenčně značenou membránou, které byly infikovány virem chřipky. Zároveň byl do média přidán inhibitor virové neuraminidázy, Oseltamivir, který zabraňuje uvolňování nově vzniklým virionům z infikovaných buněk a tím pádem zabraňuje infikování

dalších buněk. Několik hodin po kultivaci byla pozorována vyšší frekvence vzniku TNT mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami. Po 18 hodinách po infekci (hpi), byly v TNT detekovány virové proteiny hemaglutinin, nukleoprotein a matrixové proteiny 1 a 2. Tato data naznačují, že se virus chřipky šíří pomocí TNT na další neinfikované buňky (Obr. 13) (Kumar



et al., 2017).

Obrázek 13: Lokalizace imunofluorescenčně značených proteinů (NP, HA, M1, M2) viru chřipky v rámci TNT. Jsou ukázány jednotlivé optické řezy. Infikovány byly epiteliální buňky, které byly fixovány 18 hpi. Fluorescenčně značeny proteiny viru chřipky (detekce pomocí protilátek – zelená), jádra (modrá). Značené virové proteiny NP, HA, M1 a M2 byly detekovány v TNT. Převzato a upraveno z: Kumar et al., 2017.

Tento závěr byl podpořen pozorováním provedeným skupinou Robertse (Roberts et al., 2014). Autoři kultivovali psi ledvinové buňky infikované virem chřipky typu A v přítomnosti inhibitoru neuraminidázy, zanamivirem. U infikovaných buněk pozorovali zvýšené množství mezibuněčných struktur v infikovaných buňkách (Roberts et al., 2014).

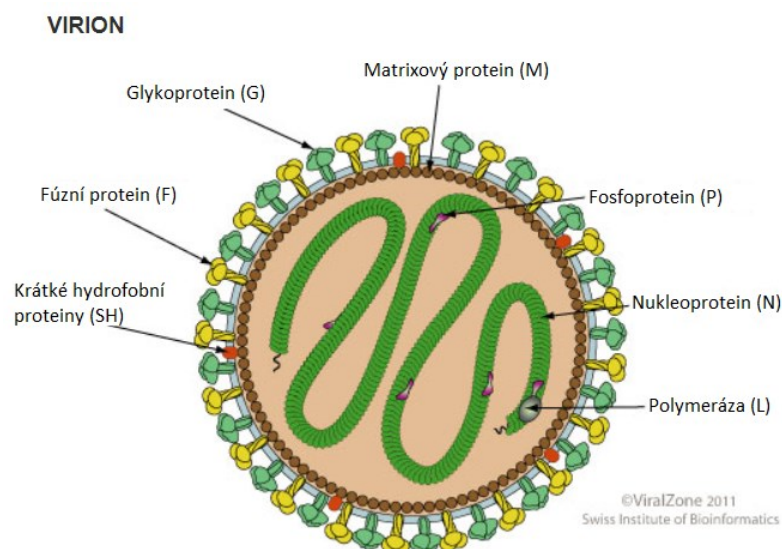
Dále byla zkoumána role proteinu Rab11a v tvorbě TNT v infikovaných buňkách. Bylo zjištěno, že Rab11a nemá výrazný vliv na tvorbu TNT, ale pomáhá transportovat ribonukleoprotein přes TNT. Na protein Rab11a se váže virový ribonukleoproteinový komplex. Tato interakce je zprostředkována podjednotkou PB2 virové polymerázy. Díky této interakci dojde k transportu ribonukleoproteinu asociovaným s Rab11a do plazmatické membrány cílové buňky. Pokud dojde ke snížení množství proteinu Rab11a v buňce, tak bude nižší i množství transportovaného genetického materiálu (Amorim et al., 2011; Ganti et al., 2021; Momose et al., 2011). Tímto způsobem může být skrz TNT transportováno všech osm virových segmentů najednou, díky čemuž v buňce příjemce mohou vznikat infekční virové částice (Ganti et al.,

2021).

3.5. Lidský metapneumovirus (HMPV)

Lidský metapneumovirus (HMPV) je patogen, způsobující respirační onemocnění, který byl poprvé izolován v roce 2001 v Nizozemí. Jedná se o hlavní příčinu infekce dolních cest dýchacích u kojenců a dětí. Napadá epitelální buňky horních cest dýchacích a dolních cest dýchacích, kde způsobuje infekce (shrnutí z: Cox and Williams, 2013).

HMPV se řadí do čeledi *Pneumoviridae*, která zahrnuje obalené viry jejichž genomem je jednořetězcová -RNA. Ve virovém obalu se nachází tři virové glykoproteiny, fúzní protein (F), glykoprotein (G) a krátké hydrofobní proteiny (SH). Pod lipidovou dvouvrstvou se nachází matrixový protein (M), který je v kontaktu s transmembránovými glykoproteiny. Ve virionu se nachází jednovláknová RNA s negativní polaritou, která je obalená nukleoproteinem (N), se kterým dále asociují fosfoprotein (P), polymerázový protein a M2 matrixový protein (Obr. 14). Virová infekce začíná navázáním povrchových glykoproteinů na buněčné receptory, následované fúzí povrchových membrán za pomoci fúzního F proteinu a uvolnění nukleokapsidy do hostitelské buňky (shrnutí z: Cox and Williams, 2013). Poté následuje transkripce virových mRNA a translace virových proteinů. Jakmile se syntetizuje dostatek N proteinu dojde k zahájení replikace virové RNA, která je následována morfogenezí virionů. Dojde k sestavení kapsid a jejich vypučení z buněčného povrchu. Vzniklé viriony mohou následně infikovat další buňky (shrnutí z: Easton et al., 2004).

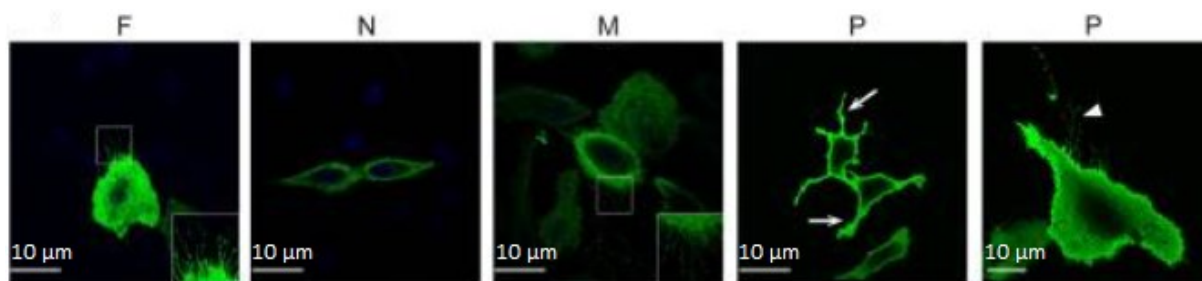


Obrázek 14: Schéma virionu HMPV. Převzato a upraveno z webové stránky ViralZone (“Pneumoviridae ~ ViralZone,” n.d.)

Pro určení, jestli se HMPV přenáší mezi buňkami prostřednictvím mezibuněčných spojů byla sledována lokalizace jednotlivých virových proteinů v buňce (El Najjar *et al.*, 2016). Již 24 hpi byly pozorovány virové proteiny, které se nacházely v nanotrubičkách tvořících síťovitou strukturu. Jednalo se o matrixový M protein, který se nacházel po celé jejich délce,

a dále nukleokapsidový N protein, který se nacházel ve středu vlákna obklopený M proteiny. Pokud byly buňky kultivovány s aktinovými inhibitory, došlo ke snížení množství infikovaných buněk vzhledem ke kultivaci bez inhibitorů. Z toho lze usuzovat, že vzniklé mezibuněčné spoje pomáhají viry šířit na okolní neinfikované buňky. Virová infekce měla také vliv na délku spojů, mezibuněčné spoje u infikovaných buněk byly dvakrát delší než u neinfikovaných. V infikovaných buňkách měly průměrně délku kolem 80 μm a mohly překlenout i větší vzdálenost, dokonce až 300 μm (El Najjar et al., 2016).

Dále byl studován vliv jednotlivých proteinů N, P, M, F viru HMPV na formování a funkci mezibuněčných spojů. Na základě jejich individuální exprese v epiteliálních buňkách se zjistilo, že některé proteiny podporují vznik mezibuněčných spojení. Protein N byl detekován v cytosolu a jeho exprese neměla vliv na buněčnou membránu a tím i vznik mezibuněčných spojení. Avšak individuální exprese proteinu F a M podporovala tvorbu krátkých membránových výrůstků a exprese proteinu P v buňkách způsobovala změny na plazmatické membráně a tvorbu spojů (Obr. 15). Zároveň se metodou FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) 72 hpi podařilo v mezibuněčných spojích detekovat virovou RNA. Z těchto dat lze usuzovat, že toto mezibuněčné spojení může sloužit nejen k transportu virových proteinů, ale i jejich genomů mezi dvěma buňkami, a tím i zvyšovat množství infikovaných buněk a podporovat šíření viru (El Najjar et al., 2016).



Obrázek 15: Lokalizace proteinů F, N, M, P viru HMPV v infikovaných buňkách. Infikovány byly lidské bronchiální epiteliální buňky. Fluorescenčně značeny virové proteiny (detekce pomocí protilátek – zelená), N – protein- jeho exprese neměla na tvorbu nanotrubic žádný vliv. F a M proteiny – jejich exprese vytvářela krátké membránové výběžky. P protein – jeho exprese způsobila tvorbu dlouhé membránové výčnělky, které se mohly větvit, byly označeny šipkami. Převzato a upraveno z: El Najjar et al., 2016.

Tato data naznačují, že HMPV se může šířit mezi buňkami pomocí mezimembránových spojů. I když není zcela jasné, že tyto spoje opravdu představují TNT, jejich charakteristika tomu nasvědčuje. Jedná se totiž o rozsáhlou síť mezibuněčných spojů, které mohou být i rozvětvené, a ve kterých byly nalezeny virové proteiny i virová RNA. Tyto struktury jsou tvořeny z aktinu i tubulinu, ale aktin se tam nachází ve výrazně větším množství než tubulinu.

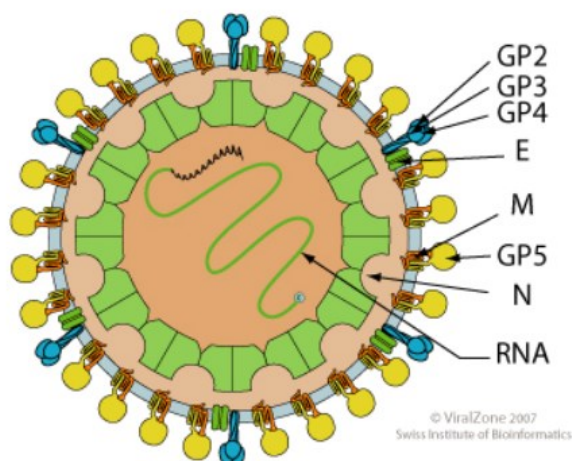
Zároveň jejich tvorba je závislá na polymeraci aktinu a ne mikrotubulů, což bylo dokázáno po přidání inhibitorů jejich polymerace. TNT mohou mít různé složení, například TNT, které se tvoří při infekci virem HIV-1, také ve své struktuře obsahují tubulin, a zároveň byly tyto struktury popsány i u buněk infikovaných jinými respiračními viry, například chřipky (El Najjar et al., 2016; Lotfi et al., 2020; Önfelt et al., 2006). Vše nasvědčuje tomu, že tyto struktury jsou TNT. Avšak pro definitivní identifikaci těchto struktur jako TNT je nutná detailnější charakterizace těchto mezibuněčných spojů.

3.6. Virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRSV)

Dalším virem, který se pravděpodobně přenáší pomocí TNT je Virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRSV) (Guo et al., 2016). Jedná se o prasečí virus, který byl objeven v roce 1990 v Evropě a USA. Způsobuje závažné onemocnění s respiračními problémy, úbytkem hmotnosti a reprodukčními problémy u prasnic, což působí problémy v živočišné výrobě (shrnuto z: Dokland, 2010).

Tento virus patří do čeledi *Arteriviridae*. Jedná se o obalený +RNA virus, který je kulovitého tvaru o průměrné velikosti 45-60 nm. Na povrchu virionu je obal, který obsahuje glykoproteiny (GP2-5) a malý obalový protein (E). Pod obalem se nachází vrstva membránového proteinu. V nukleokapsidě, která je tvořena nukleoproteinem (N), se nachází virový genom. Ten je tvořen lineární +ssRNA o velikosti 14-16kb, která je polyadenylovaná (Obr. 16) (shrnuto z: “Betaarterivirus ~ ViralZone,” n.d.).

VIRION

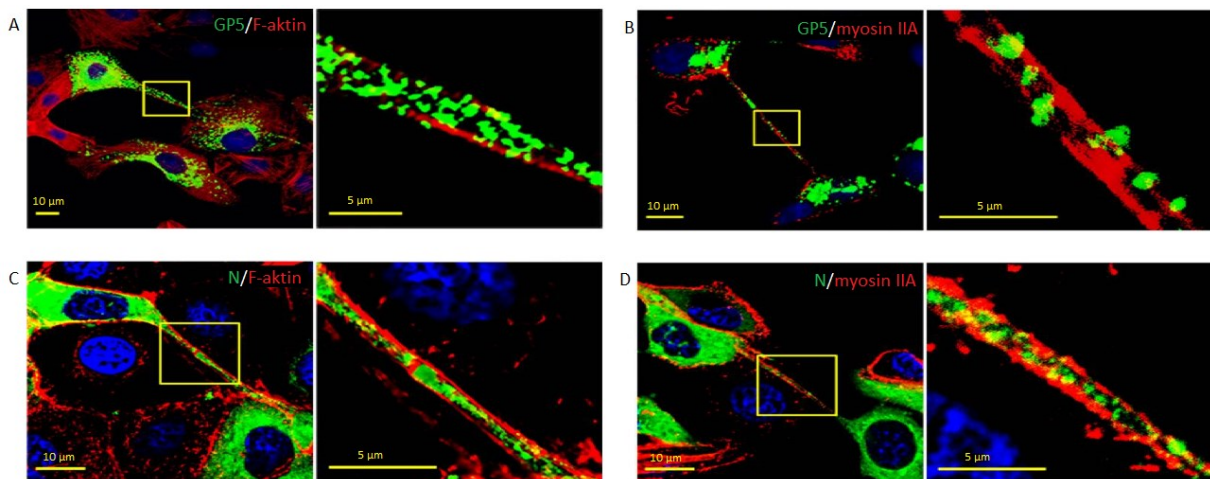


Obrázek 16: Schéma virionu PRRSV. Převzato z: (“Betaarterivirus ~ ViralZone,” n.d.)

Po navázání virionu na hostitelské receptory dojde k internalizaci viru klatrinem zprostředkovanou endocytózou. Poté dojde k fúzi membrány endozomu a virové membrány, díky čemuž dojde k uvolnění genomu do cytoplazmy. Následuje transkripce a translace virových proteinů a replikace virové RNA. Po nasyntetizování dostatečného množství

strukturních proteinů dojde k sestavení virionů na membráně endoplazmatického retikula nebo Golgiho komplexu a pomocí exocytózy jejich uvolnění z buňky (shrnutí z: “Betaarterivirus ~ ViralZone,” n.d.).

Pro prokázání, že se virus PRRSV může přenášet pomocí TNT, byla infikovaná buněčná kultura a 12 hpi byly specifickými protilátkami označeny virové proteiny. Nejdříve byly značeny virový glykoprotein (GP5) a nukleoprotein (N), aby se dokázala přítomnost viru v TNT a díky nim i jeho přenos. Dále byl obarven F-aktin a myosin IIA, aby byly detekovány TNT. Byly pozorovány dlouhé mezibuněčné spoje definované jako TNT, které obsahovaly obarvený F-aktin a myosin IIA. Také v nich byly detekovány proteiny GP5 a N (Obr. 17). Specifickými protilátkami byly obarveny i další virové proteiny (nsp1 β , nsp2, nsp2TF, nsp4, nsp7, nsp8), které byly také detekovány v nanotrubicích. Následně byla virová RNA označena metodou FISH. Virová RNA byly nalezena v nanotrubicích společně s N proteiny. Při porovnání množství TNT s neinfikovanými buňkami došlo k výraznému zvýšení jejich počtu v infikovaných buňkách, a to až 5,27 (Guo et al., 2018, 2016).



Obrázek 17: Přenos proteinů GP5 a N viru PRRSV pomocí TNT. Prezentovány jsou jednotlivé optické řezy infikovaných buněk. Infikovány byly opičí ledvinové buňky. Fluorescenčně jsou značeny virové proteiny (detekce pomocí protilátek - zelená), F-aktin (A, C)- červená, myosin IIA (B, D)- červená. Na snímcích jsou patrné značené virové proteiny, které se šíří skrze nanotrubičky do dalších buněk. Převzato a upraveno z: Guo et al., 2016.

Přenos viru PRRSV pomocí nanotrubic byl přímo prokázán v následujícím experimentu. Infikované buňky byly kultivovány s neinfikovanými v přítomnosti neutralizačních protilátek. Po 24 hpi byly pozorovány shluky infikovaných buněk, z čehož vyplývá, že se viry mohou šířit pomocí TNT a následně infikovat další buňky (Guo et al., 2016). Z těchto dat lze usuzovat, že virus PRRSV podporuje tvorbu TNT, kterými se pak může následně šířit na další buňky (Guo et al., 2016).

Infekce virem PRRSV u některých buněk způsobuje apoptózu nebo nekrózu. Při kultivaci infikovaných buněk s aktinovým inhibitorem, bylo množství apoptotických a nekrotických buněk ještě větší. Vzhledem k tomu, že bylo pozorováno, jak se mitochondrie z neinfikovaných buněk přenášejí pomocí nanotrubic, které obsahují mikrotubuly, do buněk infikovaných lze vyvodit, že TNT jsou potřebné pro transport mitochondrií, aby bylo zabráněno smrti infikovaných buněk (Guo et al., 2018).

4. Závěr

Zabránění šíření virionů mezi buňkami je jedním z podstatných mechanismů v eliminaci virové infekce v organismu. Po pomnožení viru v infikované buňce je virové potomstvo uvolňováno do okolního prostředí a může tak dojít k šíření infekce i na další buňky v organismu. Avšak imunitní systém hostitele je schopen velmi efektivně virus uvolněný z buněk eliminovat, a proto viry vyvinuly alternativní způsoby šíření mezi buňkami. Jedním z těchto alternativních způsobů šíření virové infekce jsou i TNT. Na základě různých pozorování bylo prokázáno, že viriony nebo proteiny některých virů jsou transportovány do okolních buněk pomocí TNT. Viry nejsou jen pasivními uživateli těchto struktur, samotná virová infekce má na množství nanotubic vliv. U retrovirů a herpesvirů bylo ukázáno, že exprese virových proteinů podporuje vznik TNT a tím pádem i šíření virových proteinů i samotných virionů mezi buňkami. U herpesvirů byl dokonce popsán i zcela unikátní způsob přenosu virionů z jedné buňky do druhé. Herpesvirové viriony jsou schopny vypučet z TNT ve vezikulu, který prakticky okamžitě fúzuje s membránou akceptorové buňky a dochází tak k přenosu infekčních virionů. Otázkou zůstává, jestli je tento mechanismus unikátní pro herpesviry anebo se jedná o univerzálnější způsob transportu virionů prostřednictvím TNT. Přenos virových proteinů a samotných virionů byl zatím pozorován pouze u obalených virů, proto by bylo dobré objasnit, jestli tento mechanismus přenosu je univerzálně využíván pro šíření obalených virů. A zároveň, jestli tento způsob šíření mohou využívat i viry neobalené.

Další otázkou je, jestli a jakým způsobem mohou viry ovlivnit směřování rostoucích nanotubic. Také je otázkou, pokud se nanotubicemi do okolních buněk transportují pouze některé virové proteiny, jaký je význam této události pro virovou infekci.

A samozřejmě nejdůležitější otázkou je, jestli detailní poznání přenosu viru mezi buňkami prostřednictvím TNT může být využito v lékařské praxi, a to nejenom v boji s virovými chorobami, ale také pro léčbu nádorových onemocnění nebo neurodegenerativních chorob.

5. Seznam literatury

- Abounit, S., Wu, J.W., Duff, K., Victoria, G.S., Zurzolo, C., 2016. Tunneling nanotubes: A possible highway in the spreading of tau and other prion-like proteins in neurodegenerative diseases. *Prion* 10, 344–351. <https://doi.org/10.1080/19336896.2016.1223003>
- Amorim, M.J., Bruce, E.A., Read, E.K.C., Foeglein, Á., Mahen, R., Stuart, A.D., Digard, P., 2011. A Rab11- and Microtubule-Dependent Mechanism for Cytoplasmic Transport of Influenza A Virus Viral RNA. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/JVI.02606-10>
- Andresen, V., Wang, X., Ghimire, S., Omsland, M., Gjertsen, B.T., Gerdes, H.H., 2013. Tunneling nanotube (TNT) formation is independent of p53 expression. *Cell Death Differ* 20, 1124. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.61>
- Bénard, M., Schapman, D., Lebon, A., Monterroso, B., Bellenger, M., Le Foll, F., Pasquier, J., Vaudry, H., Vaudry, D., Galas, L., 2015. Structural and functional analysis of tunneling nanotubes (TnTs) using gCW STED and gconfocal approaches. *Biology of the Cell* 107, 419–425. <https://doi.org/10.1111/boc.201500004>
- Bhat, S., Ljubojevic, N., Zhu, S., Fukuda, M., Echard, A., Zurzolo, C., 2020. Rab35 and its effectors promote formation of tunneling nanotubes in neuronal cells. *Sci Rep* 10, 16803. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74013-z>
- Bukoreshtliev, N.V., Wang, X., Hodneland, E., Gurke, S., Barroso, J.F.V., Gerdes, H.-H., 2009. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Letters* 583, 1481–1488. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.065>
- *Cifuentes-Munoz, N., El Najjar, F., Dutch, R.E., 2020. Viral cell-to-cell spread: Conventional and non-conventional ways. *Adv Virus Res* 108, 85–125. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.09.002>
- *Connolly, S.A., Jardetzky, T.S., Longnecker, R., 2021. The structural basis of herpesvirus entry. *Nat Rev Microbiol* 19, 110–121. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00448-w>
- *Cox, R.G., Williams, J.V., 2013. Breaking In: Human Metapneumovirus Fusion and Entry. *Viruses* 5, 192–210. <https://doi.org/10.3390/v5010192>
- D'Aloia, A., Berruti, G., Costa, B., Schiller, C., Ambrosini, R., Pastori, V., Martegani, E., Ceriani, M., 2018. RalGPS2 is involved in tunneling nanotubes formation in 5637 bladder cancer cells. *Experimental Cell Research* 362, 349–361. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.11.036>
- Desir, S., Dickson, E.L., Vogel, R.I., Thayanithy, V., Wong, P., Teoh, D., Geller, M.A., Steer, C.J., Subramanian, S., Lou, E., 2016. Tunneling nanotube formation is stimulated by hypoxia in ovarian cancer cells. *Oncotarget* 7, 43150–43161. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9504>
- Dilna, A., Deepak, K.V., Damodaran, N., Kielkopf, C.S., Kagedal, K., Ollinger, K., Nath, S., 2021. Amyloid- β induced membrane damage instigates tunneling nanotube-like conduits by p21-activated kinase dependent actin remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1867, 166246. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166246>
- *Dokland, T., 2010. The structural biology of PRRSV. *Virus Res* 154, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.029>
- Draber, P., Stepanek, O., Hrdinka, M., Drobek, A., Chmatal, L., Mala, L., Ormsby, T., Angelisova, P., Horejsi, V., Brdicka, T., 2012. LST1/A Is a Myeloid Leukocyte-specific Transmembrane Adaptor Protein Recruiting Protein Tyrosine Phosphatases SHP-1 and SHP-2 to the Plasma Membrane. *J Biol Chem* 287, 22812–22821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.339143>
- Dupont, M., Souriant, S., Balboa, L., Vu Manh, T.-P., Pingris, K., Rousset, S., Cougoule, C., Rombouts, Y., Poincloux, R., Ben Neji, M., Allers, C., Kaushal, D., Kuroda, M.J., Benet, S., Martinez-Picado, J., Izquierdo-Useros, N., Sasiain, M.D.C., Maridonneau-Parini, I., Neyrolles, O., Vérolet, C., Lugo-Villarino, G., 2020. Tuberculosis-associated IFN- γ induces Siglec-1 on tunneling nanotubes and favors HIV-1 spread in macrophages. *Elife* 9, e52535. <https://doi.org/10.7554/eLife.52535>
- *Easton, A.J., Domachowske, J.B., Rosenberg, H.F., 2004. Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17, 390–412. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.390-412.2004>
- El Najjar, F., Cifuentes-Munoz, N., Chen, J., Zhu, H., Buchholz, U.J., Moncman, C.L., Dutch, R.E., 2016. Human metapneumovirus Induces Reorganization of the Actin Cytoskeleton for Direct Cell-to-Cell Spread. *PLoS Pathog* 12, e1005922. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005922>
- Eugenin, E. A., Gaskill, P.J., Berman, J.W., 2009. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: A potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cellular Immunology* 254, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.08.005>
- Favoreel, H.W., Van Minnebruggen, G., Adriaensen, D., Nauwynck, H.J., 2005. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8990–8995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409099102>

- *Ferguson, M.R., Rojo, D.R., von Lindern, J.J., O'Brien, W.A., 2002. HIV-1 replication cycle. *Clin Lab Med* 22, 611–635. [https://doi.org/10.1016/s0272-2712\(02\)00015-x](https://doi.org/10.1016/s0272-2712(02)00015-x)
- Ganti, K., Han, J., Manicassamy, B., Lowen, A.C., 2021. Rab11a mediates cell-cell spread and reassortment of influenza A virus genomes via tunneling nanotubes. *PLoS Pathog* 17, e1009321. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009321>
- Garcia, J.V., Miller, A.D., 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 350, 508–511. <https://doi.org/10.1038/350508a0>
- Gousset, K., Marzo, L., Commere, P.-H., Zurzolo, C., 2013. Myo10 is a key regulator of TNT formation in neuronal cells. *Journal of Cell Science* 126, 4424–4435. <https://doi.org/10.1242/jcs.129239>
- Gousset, K., Schiff, E., Langevin, C., Marijanovic, Z., Caputo, A., Browman, D.T., Chenouard, N., de Chaumont, F., Martino, A., Enninga, J., Olivo-Marin, J.-C., Männel, D., Zurzolo, C., 2009. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* 11, 328–336. <https://doi.org/10.1038/ncb1841>
- Guo, R., Davis, D., Fang, Y., 2018. Intercellular transfer of mitochondria rescues virus-induced cell death but facilitates cell-to-cell spreading of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology, Nidovirus Research* 517, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.018>
- Guo, R., Katz, B.B., Tomich, J.M., Gallagher, T., Fang, Y., 2016. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Utilizes Nanotubes for Intercellular Spread. *J Virol* 90, 5163–5175. <https://doi.org/10.1128/JVI.00036-16>
- Hanna, S.J., McCoy-Simandle, K., Miskolci, V., Guo, P., Cammer, M., Hodgson, L., Cox, D., 2017. The Role of Rho-GTPases and actin polymerization during Macrophage Tunneling Nanotube Biogenesis. *Sci Rep* 7, 8547. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08950-7>
- Hase, K., Kimura, S., Takatsu, H., Ohmae, M., Kawano, S., Kitamura, H., Ito, M., Watarai, H., Hazelett, C.C., Yeaman, C., Ohno, H., 2009. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nat Cell Biol* 11, 1427–1432. <https://doi.org/10.1038/ncb1990>
- Hashimoto, M., Bhuyan, F., Hiyoshi, M., Noyori, O., Nasser, H., Miyazaki, M., Saito, T., Kondoh, Y., Osada, H., Kimura, S., Hase, K., Ohno, H., Suzu, S., 2016. Potential Role of the Formation of Tunneling Nanotubes in HIV-1 Spread in Macrophages. *The Journal of Immunology* 196, 1832–1841. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500845>
- He, K., Luo, W., Zhang, Yuliang, Liu, F., Liu, D., Xu, L., Qin, L., Xiong, C., Lu, Z., Fang, X., Zhang, Youyi, 2010. Intercellular Transportation of Quantum Dots Mediated by Membrane Nanotubes. *ACS Nano* 4, 3015–3022. <https://doi.org/10.1021/nn1002198>
- *Henderson, L.J., Reoma, L.B., Kovacs, J.A., Nath, A., 2020. Advances toward Curing HIV-1 Infection in Tissue Reservoirs. *J Virol* 94, e00375-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00375-19>
- Jackson, M.V., Morrison, T.J., Doherty, D.F., McAuley, D.F., Matthay, M.A., Kissenpfennig, A., O'Kane, C.M., Krasnodembkaya, A.D., 2016. Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells* 34, 2210–2223. <https://doi.org/10.1002/stem.2372>
- Jansens, R.J.J., Van den Broeck, W., De Pelsmaeker, S., Lamote, J.A.S., Van Waesberghe, C., Couck, L., Favoreel, H.W., 2017. Pseudorabies Virus US3-Induced Tunneling Nanotubes Contain Stabilized Microtubules, Interact with Neighboring Cells via Cadherins, and Allow Intercellular Molecular Communication. *J Virol* 91, e00749-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00749-17>
- *Kamoi, K., 2020. HTLV-1 in Ophthalmology. *Front Microbiol* 11, 388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00388>
- Kim, B.-W., Lee, J.-S., Ko, Y.-G., 2019. Mycoplasma exploits mammalian tunneling nanotubes for cell-to-cell dissemination. *BMB Rep* 52, 490–495. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.8.243>
- *Kleinpeter, A.B., Freed, E.O., 2020. HIV-1 Maturation: Lessons Learned from Inhibitors. *Viruses* 12. <https://doi.org/10.3390/v12090940>
- Kretschmer, A., Zhang, F., Somasekharan, S.P., Tse, C., Leachman, L., Gleave, A., Li, B., Asmaro, I., Huang, T., Kotula, L., Sorensen, P.H., Gleave, M.E., 2019. Stress-induced tunneling nanotubes support treatment adaptation in prostate cancer. *Sci Rep* 9, 7826. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44346-5>
- *Kukhanova, M.K., Korovina, A.N., Kochetkov, S.N., 2014. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Mosc)* 79, 1635–1652. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130124>
- Kumar, A., Kim, J.H., Ranjan, P., Metcalfe, M.G., Cao, W., Mishina, M., Gangappa, S., Guo, Z., Boyden, E.S., Zaki, S., York, I., García-Sastre, A., Shaw, M., Sambhara, S., 2017. Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread. *Sci Rep* 7, 40360. <https://doi.org/10.1038/srep40360>
- Lachambre, S., Chopard, C., Beaumelle, B., 2014. Preliminary characterisation of nanotubes connecting T-cells and their use by HIV-1. *Biology of the Cell* 106, 394–404. <https://doi.org/10.1111/boc.201400037>

- Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P., Yan, C., 2014. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia–reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvascular Research* 92, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2014.01.008>
- Lokar, M., Iglič, A., Veranič, P., 2010. Protruding membrane nanotubes: attachment of tubular protrusions to adjacent cells by several anchoring junctions. *Protoplasma* 246, 81–87. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0143-7>
- Lotfi, S., Nasser, H., Noyori, O., Hiyoshi, M., Takeuchi, H., Koyanagi, Y., Suzu, S., 2020. M-Sec facilitates intercellular transmission of HIV-1 through multiple mechanisms. *Retrovirology* 17, 20. <https://doi.org/10.1186/s12977-020-00528-y>
- Lou, E., Fujisawa, S., Morozov, A., Barlas, A., Romin, Y., Dogan, Y., Gholami, S., Moreira, A.L., Manova-Todorova, K., Moore, M.A.S., 2012. Tunneling Nanotubes Provide a Unique Conduit for Intercellular Transfer of Cellular Contents in Human Malignant Pleural Mesothelioma. *PLoS One* 7, e33093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033093>
- *Luo, M., 2011. Influenza Virus Entry. *Viral Molecular Machines* 726, 201–221. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9
- Momose, F., Sekimoto, T., Ohkura, T., Jo, S., Kawaguchi, A., Nagata, K., Morikawa, Y., 2011. Apical Transport of Influenza A Virus Ribonucleoprotein Requires Rab11-positive Recycling Endosome. *PLoS One* 6, e21123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021123>
- Mukerji, J., Olivieri, K.C., Misra, V., Agopian, K.A., Gabuzda, D., 2012. Proteomic analysis of HIV-1 Nef cellular binding partners reveals a role for exocyst complex proteins in mediating enhancement of intercellular nanotube formation. *Retrovirology* 9, 33. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-33>
- Okafu, G., Prevedel, L., Eugenin, E., 2017. Tunneling nanotubes (TNT) mediate long-range gap junctional communication: Implications for HIV cell to cell spread. *Sci Rep* 7, 16660. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16600-1>
- Omsland, M., Bruserud, Ø., Gjertsen, B.T., Andresen, V., 2016. Tunneling nanotube (TNT) formation is downregulated by cytarabine and NF-κB inhibition in acute myeloid leukemia (AML). *Oncotarget* 8, 7946–7963. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13853>
- Omsland, M., Pise-Masison, C., Fujikawa, D., Galli, V., Fenizia, C., Parks, R.W., Gjertsen, B.T., Franchini, G., Andresen, V., 2018. Inhibition of Tunneling Nanotube (TNT) Formation and Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Transmission by Cytarabine. *Sci Rep* 8, 11118. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29391-w>
- Önfelt, B., Nedvetzki, S., Benninger, R.K.P., Purbhoo, M.A., Sowinski, S., Hume, A.N., Seabra, M.C., Neil, M.A.A., French, P.M.W., Davis, D.M., 2006. Structurally Distinct Membrane Nanotubes between Human Macrophages Support Long-Distance Vesicular Traffic or Surfing of Bacteria. *The Journal of Immunology* 177, 8476–8483. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8476>
- Önfelt, B., Nedvetzki, S., Yanagi, K., Davis, D.M., 2004. Cutting Edge: Membrane Nanotubes Connect Immune Cells. *The Journal of Immunology* 173, 1511–1513. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1511>
- Osteikoetxea-Molnár, A., Szabó-Meleg, E., Tóth, E.A., Oszvald, Á., Izsépi, E., Kremlitzka, M., Biri, B., Nyitray, L., Bozó, T., Németh, P., Kellermayer, M., Nyitrai, M., Matko, J., 2016. The growth determinants and transport properties of tunneling nanotube networks between B lymphocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 4531–4545. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2233-y>
- *Packard, J.E., Dembowski, J.A., 2021. HSV-1 DNA Replication—Coordinated Regulation by Viral and Cellular Factors. *Viruses* 13, 2015. <https://doi.org/10.3390/v13102015>
- Panasiuk, M., Rychłowski, M., Derewońko, N., Bieńkowska-Szewczyk, K., 2018. Tunneling Nanotubes as a Novel Route of Cell-to-Cell Spread of Herpesviruses. *J Virol* 92, e00090-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00090-18>
- *Pleschka, S., 2013. Overview of influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 370, 1–20. https://doi.org/10.1007/82_2012_272
- Reichert, D., Scheinplflug, J., Karbanová, J., Freund, D., Bornhäuser, M., Corbeil, D., 2016. Tunneling nanotubes mediate the transfer of stem cell marker CD133 between hematopoietic progenitor cells. *Experimental Hematology* 44, 1092–1112.e2. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.07.006>
- Roberts, K.L., Manicassamy, B., Lamb, R.A., 2014. Influenza A Virus Uses Intercellular Connections To Spread to Neighboring Cells. *J Virol* 89, 1537–1549. <https://doi.org/10.1128/JVI.03306-14>
- Rostami, J., Holmqvist, S., Lindström, V., Sigvardson, J., Westermark, G.T., Ingelsson, M., Bergström, J., Roybon, L., Erlandsson, A., 2017. Human Astrocytes Transfer Aggregated Alpha-Synuclein via Tunneling Nanotubes. *J Neurosci* 37, 11835–11853. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0983-17.2017>

- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., Gerdes, H.-H., 2004. Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1093133>
- Saha, T., Dash, C., Jayabalan, R., Khiste, S., Kulkarni, A., Kurmi, K., Mondal, J., Majumder, P.K., Bardia, A., Jang, H.L., Sengupta, S., 2022. Intercellular nanotubes mediate mitochondrial trafficking between cancer and immune cells. *Nat. Nanotechnol.* 17, 98–106. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-01000-4>
- Sartori-Rupp, A., Cordero Cervantes, D., Pepe, A., Gousset, K., Delage, E., Corroyer-Dulmont, S., Schmitt, C., Krijnse-Locker, J., Zurzolo, C., 2019. Correlative cryo-electron microscopy reveals the structure of TNTs in neuronal cells. *Nat Commun* 10, 342. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08178-7>
- Schiller, C., Diakopoulos, K.N., Rohwedder, I., Kremmer, E., von Toerne, C., Ueffing, M., Weidle, U.H., Ohno, H., Weiss, E.H., 2013. LST1 promotes the assembly of a molecular machinery responsible for tunneling nanotube formation. *Journal of Cell Science* 126, 767–777. <https://doi.org/10.1242/jcs.114033>
- Souriant, S., Balboa, L., Dupont, M., Pingris, K., Kviatcovsky, D., Cougoule, C., Lastrucci, C., Bah, A., Gasser, R., Poincloux, R., Raynaud-Messina, B., Saati, T.A., Inwentarz, S., Poggi, S., Moraña, E.J., González-Montaner, P., Corti, M., Lagane, B., Vergne, I., Allers, C., Kaushal, D., Kuroda, M.J., Sasiain, M. del C., Neyrolles, O., Maridonneau-Parini, I., Lugo-Villarino, G., Vérolet, C., 2019. Tuberculosis exacerbates HIV-1 infection through IL-10/STAT3-dependent tunneling nanotube formation in macrophages. *Cell Rep* 26, 3586–3599.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.091>
- Sowinski, S., Jolly, C., Berninghausen, O., Purbhoo, M.A., Chauveau, A., Köhler, K., Oddos, S., Eissmann, P., Brodsky, F.M., Hopkins, C., Önfelt, B., Sattentau, Q., Davis, D.M., 2008. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 10, 211–219. <https://doi.org/10.1038/ncb1682>
- Tardivel, M., Bégard, S., Bousset, L., Dujardin, S., Coens, A., Melki, R., Buée, L., Colin, M., 2016. Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathol Commun* 4, 117. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0386-4>
- Uhl, J., Gujarathi, S., Waheed, A.A., Gordon, A., Freed, E.O., Gousset, K., 2019. Myosin-X is essential to the intercellular spread of HIV-1 Nef through tunneling nanotubes. *J Cell Commun Signal* 13, 209–224. <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0493-z>
- Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscetti, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D., Franchini, G., 2010. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20738–20743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009635107>
- Veranič, P., Lokar, M., Schütz, G.J., Weghuber, J., Wieser, S., Hägerstrand, H., Kralj-Iglič, V., Iglič, A., 2008. Different Types of Cell-to-Cell Connections Mediated by Nanotubular Structures. *Biophys J* 95, 4416–4425. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131375>
- Wang, X., Gerdes, H.-H., 2015. Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death Differ* 22, 1181–1191. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.211>
- Wang, Y., Cui, J., Sun, X., Zhang, Y., 2011. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ* 18, 732–742. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.147>
- Watkins, S.C., Salter, R.D., 2005. Functional Connectivity between Immune Cells Mediated by Tunneling Nanotubules. *Immunity* 23, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.009>
- Xu, W., Santini, P.A., Sullivan, J.S., He, B., Shan, M., Ball, S.C., Dyer, W.B., Ketas, T.J., Chadburn, A., Cohen-Gould, L., Knowles, D.M., Chiu, A., Sanders, R.W., Chen, K., Cerutti, A., 2009. HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA class switching by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat Immunol* 10, 1008–1017. <https://doi.org/10.1038/ni.1753>
- *Yan, C., Theodorescu, D., 2018. RAL GTPases: Biology and Potential as Therapeutic Targets in Cancer. *Pharmacol Rev* 70, 1–11. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014415>
- Yang, F., Zhang, Yanbin, Liu, S., Xiao, J., He, Y., Shao, Z., Zhang, Yuhui, Cai, X., Xiong, L., 2022. Tunneling Nanotube-Mediated Mitochondrial Transfer Rescues Nucleus Pulposus Cells from Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2022, 3613319. <https://doi.org/10.1155/2022/3613319>
- Zhu, D., Tan, K.S., Zhang, X., Sun, A.Y., Sun, G.Y., Lee, J.C.-M., 2005. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *Journal of Cell Science* 118, 3695–3703. <https://doi.org/10.1242/jcs.02507>
- Zhu, H., Xue, C., Xu, X., Guo, Y., Li, X., Lu, J., Ju, S., Wang, Y., Cao, Z., Gu, X., 2016. Rab8a/Rab11a regulate intercellular communications between neural cells via tunneling nanotubes. *Cell Death Dis* 7, e2523. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.441>

Zhu, S., Bhat, S., Syan, S., Kuchitsu, Y., Fukuda, M., Zurzolo, C., 2018. Rab11a–Rab8a cascade regulates the formation of tunneling nanotubes through vesicle recycling. *Journal of Cell Science* 131, jcs215889. <https://doi.org/10.1242/jcs.215889>

review v seznamu literatury označena *

6. Zdroj z internetu

Betaarterivirus ~ ViralZone [WWW Document], n.d. URL <https://viralzone.expasy.org/7776> (accessed 3.14.22).

Deltaretrovirus ~ ViralZone [WWW Document], n.d. URL https://viralzone.expasy.org/91?outline=all_by_species (accessed 3.9.22).

H1N1 subtype ~ ViralZone [WWW Document], n.d. URL https://viralzone.expasy.org/131?outline=all_by_species (accessed 3.9.22).

Herpesviridae ~ ViralZone [WWW Document], n.d. URL https://viralzone.expasy.org/176?outline=all_by_species (accessed 3.9.22).

Human immunodeficiency virus 1 ~ ViralZone [WWW Document], n.d. URL https://viralzone.expasy.org/7?outline=all_by_species (accessed 3.9.22).

Pneumoviridae ~ ViralZone [WWW Document], n.d. URL https://viralzone.expasy.org/7877?outline=all_by_species (accessed 3.9.22).