

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

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



Jakub Cibulka

Viry a jaderný cytoskelet
Viruses and the nuclear cytoskeleton

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2011

Děkuji své školitelce, doc. Jitce Forstové, za pomoc a cenné rady při sepisování této práce.

Prohlášení:

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

V Praze, 01.05.2011

Podpis

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
ABSTRAKT	5
ABSTRACT	5
1 ÚVOD	6
2 JADERNÝ CYTOSKELET	7
2.1 JADERNÝ AKTIN	7
2.2 JADERNÉ LAMINY	9
3 INTERAKCE VIRŮ S JADERNÝM CYTOSKELETEM	11
3.1 INTERAKCE VIRŮ S JADERNÝM AKTINEM	11
3.1.1 INTERAKCE HERPESVIRŮ S JADERNÝM AKTINEM	11
3.1.1.1 Herpesviry	11
3.1.1.2 Alfaherpesviry indukují tvorbu aktinových filament v jádrech infikovaných buněk	12
3.1.1.3 Role jaderného aktinu v morfologických změnách jader u buněk infikovaných HSV-1	15
3.1.1.4 Aktin může být součástí virionu herpesvirů	16
3.1.2 INTERAKCE BAKULOVIRŮ S JADERNÝM AKTINEM	17
3.1.2.1 Bakuloviry	17
3.1.2.2 Jaderná aktinová filamenta jsou nezbytná pro morfogenezi nukleokapsid <i>Autographa californica</i> MNPV a dalších nukleopolyhedrovirů	17
3.1.2.3 <i>Autographa californica</i> MNPV dokáže lokalizovat cytoplasmatický aktin do jádra buňky	18
3.1.2.4 Mechanismus polymerace jaderného aktinu u nukleopolyhedrovirů	19
3.1.3 INTERAKCE RETROVIRŮ S JADERNÝM AKTINEM	21
3.2 INTERAKCE VIRŮ S JADERNÝMI LAMINY	23
3.2.1 INTERAKCE HERPESVIRŮ S JADERNÝMI LAMINY	23
3.2.2 PŘI INFEKCI HERPESVIRY DOCHÁZÍ K ROZRUŠENÍ JADERNÉ LAMINY	24
3.2.3 MECHANISMUS ROZRUŠENÍ JADERNÉ LAMINY: HERPES SIMPLEX VIRUS 1	24
3.2.3.1 Virové proteiny asociované s jadernou membránou	24
3.2.3.2 Virové kinázy	26
3.2.3.3 Hostitelské faktory: protein kináza C	28
3.2.3.4 Shrnutí mechanismů disrupce jaderné laminy virem HSV-1	28
3.2.4 MECHANISMUS ROZRUŠENÍ JADERNÉ LAMINY: OSTATNÍ HERPESVIRY	29
3.3 DALŠÍ INTERAKCE VIRŮ S JADERNÝM CYTOSKELETEM	30
4 ZÁVĚR	31
5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	32

Seznam použitých zkratk

ABPs	actin-binding proteins	proteiny vázající aktin
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multiple nucleopolyhedrovirus	<i>Autographa californica</i> multiple nukleopolyhedrovirus
Arp2/3	actin-related protein 2/3	komplex aktivující nukleaci aktinových filament
ARPs	actin-related proteins	proteiny příbuzné aktinu
BV	budded virus	typ virové částice bakulovirů
Cdc14B	cell division cycle 14 homolog B	fosfatáza účastnící se regulací buněčného cyklu
Cdc2	cell division cycle 2 (cyclin-dependent kinase 1)	cyklin dependetní kináza 1
CTE	constitutive transport element	konstitutivní transportní element
DMSO	dimethyl sulphoxide	dimethyl sulfoxid
dsDNA	double-stranded DNA	dvouvláknová DNA
EBV	Epstein-Barr virus	virus Epstein a Barrové
EGFP	enhanced green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein (derivát GFP s lepšími fluorescenčními vlastnostmi)
eIF-5A	eukaryotic translation initiation factor 5A	eukaryotický translační iniciační faktor 5A
F-aktin	filamentous actin	filamentární aktin
FITC	fluorescein isothiocyanate	fluorescein isothiokyanát
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching	obnovení fluorescence v místě vysvícení, metoda sledující dynamiku fluor. sloučenin
G-aktin	globular actin	globulární, monomerní aktin
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
GV	granulovirus	granulovirus
HCMV	human cytomegalovirus	lidský cytomegalovirus
HIV-1	human immunodeficiency virus 1	virus lidského imunodeficientu typu 1
hpi	hours postinfection	hodiny po infekci
HSV-1	herpes simplex virus 1	herpes simplex virus 1
HSV-2	herpes simplex virus 2	herpes simplex virus 2
ICP8	infected cell protein 8	herpesvirový protein vážící jednovláknou DNA
Jasp	jasplakinolide	jasplakinolid

KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	virus Kaposiho sarkomu
LAP2	lamina-associated polypeptide 2	s laminou asociovaný polypeptid 2
LatA	latrunculin A	latrunculin A
LBR	lamin B receptor	receptor laminu B
MCMV	mouse cytomegalovirus	myší cytomegalovirus
MNPV	multiple nucleopolyhedrovirus	nukleopolyhedrovirus, který má více nukleokapsid v jednom obalu (v ODV)
MPMV	Mason-Pfizer monkey virus	Mason-Pfizer monkey virus
NES	nuclear export signal	jaderný exportní signál
NLS	nuclear localization signal	jaderný lokalizační signál
NMI	nuclear myosin I	jaderný myosin I
NPV	nucleopolyhedrovirus	nukleopolyhedrovirus
ODV	occlusion-derived virus	typ virové částice bakulovirů
PKC(PKCα, δ)	protein kinase C (isoform α , δ)	protein kináza C (izoformy α a δ)
PKI	protein kinase inhibitor	inhibitor protein kinázy
PLFs	pore-linked filaments	filamenta obsahující jaderný aktin a protein 4.1
PRV	pseudorabies virus	pseudorabies virus
Rev	Regulator of expression of viral proteins	protein HIV-1, zajišťuje export nesestřížených RNA
RNA-FISH	RNA fluorescence in situ hybridization	fluorescenční RNA in situ hybridizace
RRE	Rev response element	vlásečka na nesestřížených RNA HIV-1, váže protein Rev
SNPV	single nucleopolyhedrovirus	nukleopolyhedrovirus, který má jednu nukleokapsidu v jednom obalu (v ODV)
SWI/SNF	SWItch/Sucrose NonFermentable (nucleosome remodeling complex)	chromatin remodelující komplex u kvasinek
VP26	viral protein 26	hlavní kapsidový protein pseudorabies viru
VP80	viral protein 80	protein <i>Autographa californica</i> MNPV, interaguje s jaderným aktinem
Vpr	viral protein R	virový protein R
VZV	varicella zoster virus	virus varicella zoster
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein	protein aktivující komplex Arp2/3
WSTF-SNF2h	Williams Syndrome transcription factor-Sucrose nonfermenting protein 2 homolog	chromatin remodelující komplex, interaguje s NMI

Abstrakt

Jaderný cytoskelet (nukleoskelet) zajišťuje strukturní integritu jádra a účastní se řady klíčových procesů včetně transkripce, remodelace chromatinu nebo transportu mRNA. Je tvořen jadernými laminy, jaderným aktinem a dalšími proteiny. Některé viry replikující se v jádře využívají jaderný cytoskelet v některých fázích životního cyklu, v jiných případech naopak může představovat pro virovou infekci překážku. Herpesviry potřebují jaderný aktin ke skládání a transportu virových kapsid. V úniku z jádra jim však brání jaderná lamina, kterou musí rozrušit. U bakulovirů se jaderný aktin také podílí na správné morfogenezi kapsid a pravděpodobně i na jejich exportu z jádra. U některých retrovirů byl ukázán transport nesestřížených RNA z jádra pomocí jaderného aktinu a existují i důkazy o jimi indukované destrukci jaderné laminy. V této práci se podrobně zabývám interakcemi virů (výše zmíněných čeledí) s jaderným cytoskeletem (konkrétně s jaderným aktinem a laminy).

Klíčová slova: jaderný cytoskelet, nukleoskelet, jaderný aktin, lamin, herpesviry, bakuloviry, retroviry

Abstract

The nuclear cytoskeleton (the nucleoskeleton) provides a structural integrity to the nucleus and is involved in number of key processes including transcription, chromatin remodelling and mRNA transport. The nucleoskeleton consists of nuclear lamins, nuclear actin and other proteins. Some viruses, which replicate themselves in the nucleus, use nuclear cytoskeleton in their life-cycle. On the other hand the nucleoskeleton may also represent a barrier for viral infection. Herpesviruses need nuclear actin for capsid assembly and transport, but they have to desintegrate the nuclear lamina in order to escape the nucleus. Nuclear actin also participates in the morphogenesis and probably nuclear export of baculovirus capsids. Some retroviruses transport their unspliced RNAs from the nucleus using nuclear actin and there is also some evidence of retrovirus-induced nuclear lamina disruption. In this work, I focus on the interactions of above-mentioned viruses with the nuclear cytoskeleton (namely nuclear actin and lamins).

Key words: nuclear cytoskeleton, nucleoskeleton, nuclear actin, lamin, herpesviruses, baculoviruses, retroviruses

1 Úvod

Viry jsou intracelulární parazité využívající ve svém životním cyklu řadu buněčných faktorů. Mezi tyto faktory patří i cytoskelet hostitelské buňky, který slouží mnoha virům mimo jiné k transportu virionů v buňce. Některé RNA viry a většina DNA virů se replikují v buněčném jádře. Nepřekvapuje proto, že i zde dochází k interakcím s mnoha hostitelskými proteiny a také k adaptacím jaderných procesů pro potřebu těchto virů.

Máme stále více důkazů o existenci jaderného cytoskeletu (či nukleoskeletu), který tvoří organizované struktury, zajišťující strukturní integritu jádra, jeho kompartmentarizaci a účastníci se mnoha jaderných dějů. Nejdéle známou skupinou jaderných cytoskeletárních proteinů jsou laminy, intermediární filamenta třídy V, která představují hlavní složku jaderné laminy a pravděpodobně i interního nukleoskeletu. Za součást jaderného cytoskeletu dnes považujeme také aktin, jehož existence a funkce v jádře byla dlouhou dobu předmětem značné kontroverze, a další proteiny jako například spektrin nebo titin (Zhong, Wilson and Dahl 2010).

V této práci se zaměřím na popis známých interakcí virů s jaderným cytoskeletem, konkrétně s jaderným aktinem a laminy. Ve druhé kapitole nejprve stručně představím funkci a formu těchto proteinů v jádře, ve třetí kapitole se pak budu věnovat vzájemným interakcím jaderného cytoskeletu a virů. Tyto interakce dále roztřídím podle typu proteinu (aktin, laminy) a podle virových čeledí. Poznatky, které nevydají na samostatnou kapitolu, stručně uvedu v kapitole 3.3.

2 Jaderný cytoskelet

V této kapitole bych rád stručně představil jaderný aktin a laminy, pravděpodobně nejvíce prozkoumané formy jaderného cytoskeletu (nukleoskeletu). V poslední době byly v buněčných jádrech popsány i jiné cytoskeletární proteiny (často shodné nebo podobné s cytoplasmatickými) (Zhong et al. 2010), o jejich interakcích s viry se ale neví prakticky nic. Proto se dále zaměřím jen na popis dvou výše zmíněných proteinů, u kterých není sporu, že hrají důležitou roli v infekcích několika virů.

2.1 Jaderný aktin

Funkční přítomnost aktinu v jádře byla až donedávna značně kontroverzním tématem i přesto, že se již koncem sedmdesátých let začaly objevovat práce popisující aktin v jádrech oocytů obojživelníků (dokonce i v polymerní formě) (Clark and Rosenbaum 1979). Byla ukázána i nezbytnost aktinu pro transkripci na „lampbrush“ (štetkovitých) chromosomech mloka *Pleurodeles waltlii* (Scheer et al. 1984). Aktin nacházející se v jádrech byl často považován za cytoplasmatickou kontaminaci při izolaci, experimentální artefakt nebo za část aktinových monomerů, které pasivně difundovaly z cytoplasmy do jádra bez zjevného účelu. Během posledního desetiletí se však nahromadila řada důkazů, které nejen potvrzují existenci jaderného aktinu, ale naznačují i celou řadu jeho funkcí v jaderných procesech. Historii výzkumu jaderného aktinu dobře popsali Pederson a Aebi (Pederson and Aebi 2002).

Jaderný β -aktin hraje významnou roli v transkripci, transkripční regulaci a remodelaci chromatinu (shrnuto například v: Miralles and Visa 2006, Zheng et al. 2009, Olave, Reck-Peterson and Crabtree 2002). Především je zapotřebí k transkripci genů pomocí všech tří RNA polymeráz (Hofmann et al. 2004, Hu, Wu and Hernandez 2004, Philimonenko et al. 2004). Kromě toho se ukazuje, že jaderný aktin váže některé pre-mRNA vazebné proteiny na nascentním transkriptu (Percipalle et al. 2001, Percipalle et al. 2002, Kukalev et al. 2005) a dokáže takto i rekrutovat histon acetyltransferázy do aktivně transkribovaných míst, čímž dále podporuje transkripci v daném místě (Sjölander et al. 2005). Jaderný aktin se podílí nejen na kovalentních modifikacích histonů, ale je také součástí chromatin remodelujících komplexů, například z rodiny SWI/SNF (Zhao et al. 1998).

V buněčných jádrech najdeme kromě aktinu i jadernou izoformu myosinu I (nuclear myosin I, NMI) (Nowak et al. 1997). NM1 je esenciální pro transkripci pomocí RNA polymerázy I (Philimonenko et al. 2004) i RNA polymerázy II (Pestic-Dragovich et al. 2000, Hofmann et al. 2006) a interaguje s chromatin remodelujícím komplexem WSTF-SNF2h, který

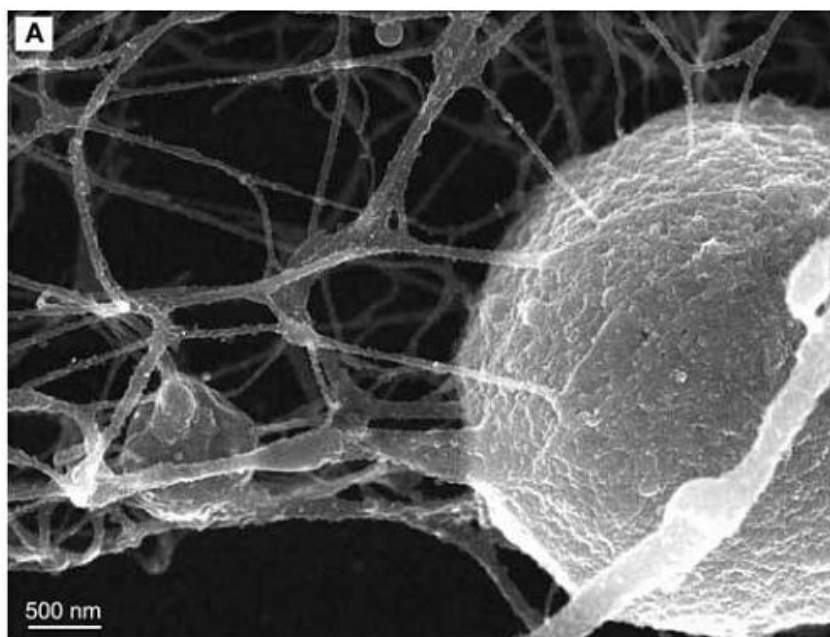
je zapotřebí pro transkripci genů pro rRNA (Percipalle et al. 2006). Další práce potvrzují funkci jaderného aktinu a NMI v transkripci RNA polymerázou I a naznačují vzájemnou kooperaci mezi těmito dvěma proteiny (Fomproix and Percipalle 2004, Kyselá et al. 2005). Ye a další navíc ukázali, že pro transkripci RNA polymerázou I je třeba tvorba aktinových polymerů či oligomerů a fungování jaderného myosinu jako molekulárního motoru (Ye et al. 2008).

Jakkoliv máme dnes poměrně velké množství poznatků o funkci aktinu v jádře, stále víme velmi málo o jeho formě. K pochybám o existenci jaderného aktinu vedlo také to, že za normálních fyziologických podmínek nebyl detekován v jádře ve své filamentární formě jako F-aktin (například fluorescenčně značeným faloidinem) (Pederson and Aebi 2002, Bettinger, Gilbert and Amberg 2004). Jaderný aktin by však mohl kromě monomerní formy nabývat i jiných oligomerních nebo polymerních forem než je klasický F-aktin. Tuto možnost potvrzuje i fakt, že jaderný aktin může existovat ve více konformacích, jak ukázaly imunocytochemické metody (Schoenenberger et al. 2005). Značná část aktinu v jádře také má dynamiku odpovídající rychle se obnovujícím polymerům (McDonald et al. 2006). Existenci polymerní formy aktinu v jádře implikují i výše zmíněné závěry práce Ye et al. 2008. Zde je také dobré zdůraznit, že k akumulaci aktinu v jádře dochází při různých buněčných stresech (například teplotní šok nebo vystavení buněk dimethyl sulfoxidu) (Bettinger et al. 2004).

Kiseleva a kolegové pozorovali trojrozměrnou síť filament v jádrech oocytů *Xenopus laevis*. Tato filamenta („pore-linked filaments“, PLFs) spojovala komplexy jaderného póru se subnukleárními organelami (obr. 1) a obsahovala aktin a aktin-vazebný protein 4.1. Jejich formace byla citlivá na depolymeraci i stabilizaci aktinu (Kiseleva et al. 2004). Na PLFs a komplex jaderného póru se váže i jaderný myosin I (NMI), který se podílí (mimo jiné – viz výše) na maturaci rRNA a exportu prekurzorů ribozomálních podjednotek z jádra (Obrdlík et al. 2010). Jaderný aktin na PLFs se možná také účastní exportu retrovirových RNA a některých buněčných proteinů z jádra (Hofmann et al. 2001, Kimura et al. 2000) (viz kapitola 3.1.3).

Jaderný aktin se tedy uplatňuje nejen v regulacích genové exprese, ale pravděpodobně je také součástí nukleoskeletárních struktur, které zprostředkovávají jaderný transport či určují morfologii buněčného jádra (další poznatky shrnuty v recentním review: Castano et al. 2010)

Na závěr bych rád dodal, že kromě aktinu se v jádře vyskytuje rovněž značné množství aktin vazebných proteinů (actin-binding proteins, ABPs) a proteinů odvozených od aktinu (actin-related proteins, ARPs; sdílí homologii s aktinem). Tyto proteiny fungují (často v kooperaci s aktinem) v rozličných jaderných procesech (shrnuto v: Chen and Shen 2007, Castano et al. 2010), jejich popis nicméně spadá nad rámec této práce.



Obr. 1: Filamenta v jádrech oocytů *X. laevis* napojující se na velkou subnukleární organelu. Tato filamenta spojující komplexy jaderného póru se subnukleárními organelami obsahují aktin a aktin vazebný protein 4.1. Vizualizováno metodou „field emission scanning electron microscopy“ (feSEM). (Kiseleva et al. 2004)

2.2 Jaderné laminy

Jaderné laminy náleží do proteinové rodiny intermediárních filament (konkrétně do třídy V) a mají typickou strukturu pro tyto proteiny: centrální α -helikální „rod“ doménu, krátkou nehelikální N-koncovou doménu a rozměrnou C-koncovou globulární doménu. U savců se nacházejí čtyři hlavní druhy laminů. Laminy A a C jsou různými sestřihovými variantami téhož genu a označujeme je jako laminy A-typu, laminy B1 a B2 (laminy B-typu) jsou kódovány samostatnými geny. Laminy A- a B-typu se navzájem odlišují některými charakteristikami, například isoelektrickým bodem (neutrální u A-laminů, kyselejší u B-laminů) a chováním během mitózy (A-laminy jsou solubilizovány, B-laminy zůstávají asociovány s membránami – jsou narozdíl od A-laminů permanentně isoprenylovány). V dnešní době považujeme laminy za klíčové hráče v mnoha jaderných procesech včetně replikace, transkripce, organizace chromatinu, buněčné diferenciace a dalších (shrnutí v: Prokocimer et al. 2009). S mutacemi v genech kódujících komponenty jaderné laminy, především v genu LMNA (kóduje lamin A) je spojeno mnoho lidských onemocnění, tzv. laminopatií (Worman and Bonne 2007).

Laminy představují hlavní komponentu jaderné laminy, proteinové filamentární vrstvy, která se nachází mezi vnitřní jadernou membránou a chromatinem a která zásadně přispívá k udržení struktury jaderného obalu. Naše představy o struktuře jaderné laminy jsou založeny zejména na jejím studiu v obřích oocytech *Xenopus laevis*, protože jaderný obal těchto buněk

lze snadno izolovat bez asociovaného chromatinu. Hlavní komponentou laminy oocytů *X. laevis* je lamin LIII, lamin B-typu, který tvoří pravidelnou síť filament širokých 10 nm. Podle původní představy byla tato síť tvořena shodnými navzájem kolmo ležícími filamenty (Aebi et al. 1986). Goldberg a další ale při bližším prozkoumání laminy *X. laevis* zjistili, že tvoří dvojrozměrnou vrstvu skládající se z paralelně běžících vláken, která jsou navzájem v pravidelných intervalech pospojována tenčími filamenty. Vzhledem k tomu, že vzdálenosti mezi hlavními paralelními vlákny a mezi spojeními jsou podobné (okolo 15 nm), budí lamina zdání pravidelné sítě (Goldberg et al. 2008). Autoři dále zkusili exprimovat geny pro lamin LIII, lamin B2 a lamin A v oocytech exogenně. Exogenní lamin LIII tvořil identické struktury jako endogenní. Exogenně produkováný lamin B2 indukoval formaci intranukleárních membrán a tvořil na nich tenčí a méně uspořádaná vlákna. Vlákna laminu A měla větší průměr než laminy B-typu a tvořila kompaktní vrstvu asociovanou s endogenní laminou oocytu. Lamina obsahující i lamin A byla výrazně tlustší a udělovala jádru oocytu vysokou mechanickou odolnost (Goldberg et al. 2008). Ukazuje se tedy, že struktura jaderné laminy se může velmi lišit v závislosti na jejím složení a pravděpodobně také na buněčném typu. Naše představy založené na pravidelně uspořádané lamině oocytů *X. laevis* tak nemusí příliš odpovídat skutečnosti v jiných buňkách.

Laminy se nenachází jen v oblasti jaderné periferie, ale byly pozorovány i ve formě intranukleárních tělísek (Bridger et al. 1993, Goldman et al. 1992, Moir, Montag-Lowy and Goldman 1994) a v případě laminu A i jako součást sítě filament uvnitř jádra. Lamin A je proto pokládán za součást nukleoskeletu či jaderné matrix (Hozák et al. 1995, Barboro et al. 2002, Barboro et al. 2003, Neri et al. 1999).

3 Interakce virů s jaderným cytoskeletem

3.1 Interakce virů s jaderným aktinem

3.1.1 Interakce herpesvirů s jaderným aktinem

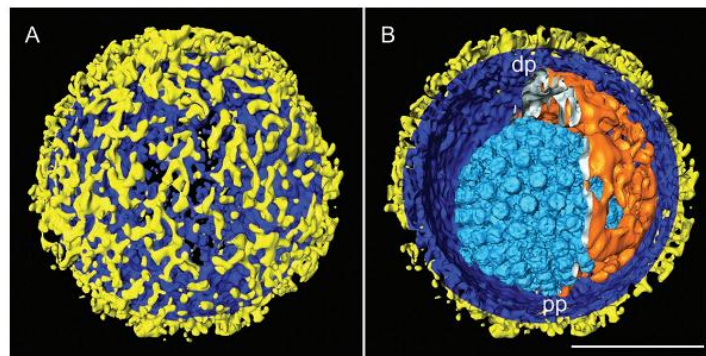
3.1.1.1 Herpesviry

Herpesviry jsou velké obalené viry s komplexní strukturou. Virová částice se skládá z obalu tvořeného lipidickou membránou hostitelské buňky s četnými virovými membránovými (glyko)proteiny, ikosahedrální kapsidy a core, které obsahuje lineární dvouvláknovou DNA. Mezi virovou kapsidou a obalovou membránou je ještě přítomna asymetricky uložená amorfnní vrstva virových proteinů zvaná tegument (Grünwald et al. 2003, van Hal and Dwyer 2009). Struktura virionu herpes simplex viru 1 je schématicky znázorněna na obrázku číslo 2. Herpetické viry (čeleď *Herpesviridae*) se podle klasického rozdělení dělí na tři samostatné podčeledi. Mezi alfaherpesviry (*Alphaherpesvirinae*) patří například herpes simplex virus 1 (HSV-1), herpes simplex virus 2 (HSV-2), virus varicella zoster (VZV) a pseudorabies virus (PRV). Do podčeledi betaherpesvirů (*Betaherpesvirinae*) řadíme mimo jiné lidský nebo myší cytomegalovirus (HCMV, MCMV). Typickými zástupci gamaherpesvirů (*Gammapherpesvirinae*) jsou lidské patogeny virus Epstein a Barrové (EBV) a virus Kaposiho sarkomu (KSHV) (Whitley 2006, van Hal and Dwyer 2009).

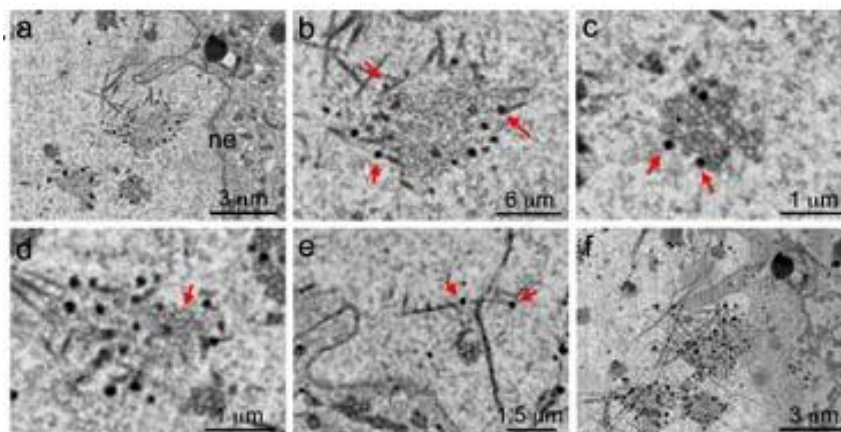
Většina důležitých dějů v životním cyklu herpesvirů probíhá v buněčném jádře včetně virové transkripce (Knipe et al. 1987, Leopardi et al. 1997, Phelan et al. 1997, Randall and Dinwoodie 1986), replikace (Randall and Dinwoodie 1986, Phelan et al. 1997) a enkapsidace genomu (de Bruyn Kops et al. 1998, Ward, Ogle and Roizman 1996). Virová replikace, pozdní transkripce a tvorba kapsid probíhá v tzv. replikačních kompartmentech. Replikační kompartmenty jsou morfologické struktury jádra charakteristické přítomností virového proteinu vázícího jednovláknovou DNA (single-strand DNA-binding protein) ICP8 a dalších virových a buněčných faktorů účastnících se výše zmíněných dějů (de Bruyn Kops et al. 1998, Knipe et al. 1987, Phelan et al. 1997). Replikační kompartmenty vznikají postupným zvětšováním a fúzí menších pre-replikačních míst (Taylor et al. 2003), přičemž dochází k dramatickým změnám v morfologii jader, marginalizaci hostitelského chromatinu a nakonec disrupci jaderné laminy (Scott and O'Hare 2001, Simpson-Holley et al. 2005, Simpson-Holley et al. 2004, Reynolds, Liang and Baines 2004).

3.1.1.2 Alfaherpesviry indukují tvorbu aktinových filament v jádrech infikovaných buněk

Feierbach et al. zjistili, že pseudorabies virus (PRV) vyvolává tvorbu filament v jádrech infikovaných neuronů (myších periferních ganglií) (Feierbach et al. 2006). Pozorovaná filamenta byla v průměru 3 μm dlouhá a široká 25-100 nm (jednalo se tedy spíše o svazky filament), nacházela se jen v infikovaných buňkách a asociovala s virovými kapsidami (viz obr. 3). Podobná vlákna byla navíc pozorována už dříve u neuronů infikovaných herpes simplex virem 1 a herpes simplex virem 2 (HSV-1, HSV-2) (Ecob-Johnston and Whetsell 1979).

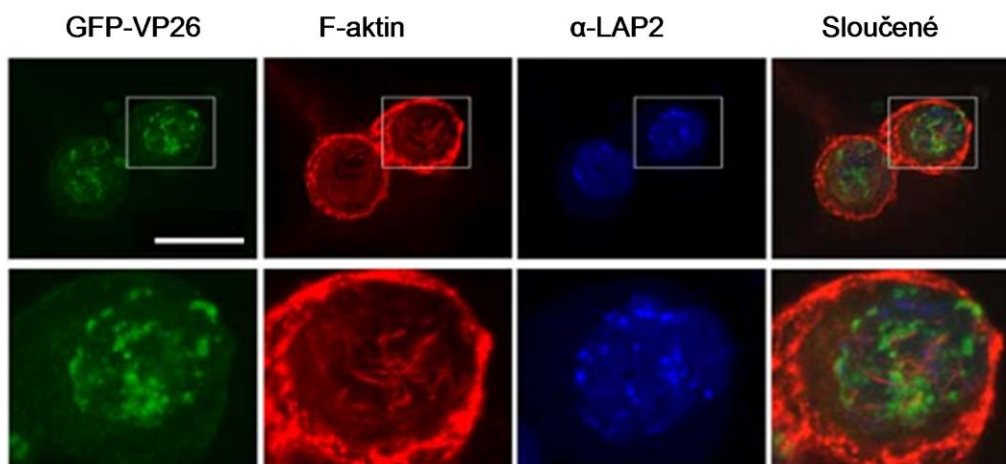


Obr. 2: Schématické znázornění virionu HSV-1 vytvořené na základě elektronové tomografie. (A) Povrch virionu. Žlutě jsou znázorněny virové glykoproteiny („spikes“). (B) Řez virionem. Světle modře ikosahedrální kapsida, oranžově asymetrická vrstva tegumentu, tmavě modře membrána a žlutě povrchové glykoproteiny. Dp = distální pól, pp = proximální pól virionu. Měřítko = 100 nm. Převzato z: Grünwald et al. 2003.



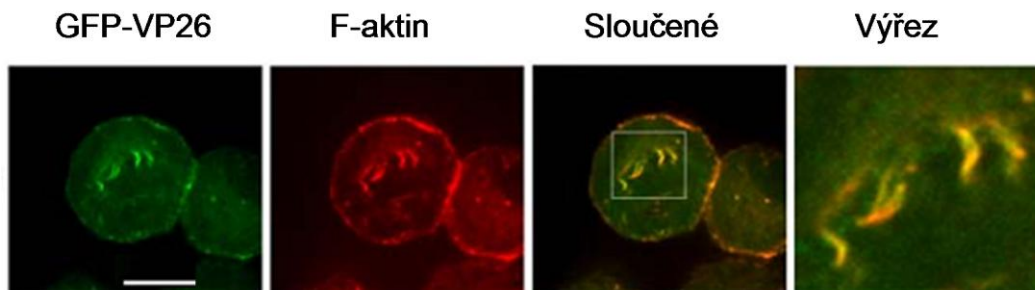
Obr. 3: Asociace filament s kapsidami PRV v jádrech periferních neuronů (snímky SBFSEM – „serial block-face scanning electron microscopy“). (a) Filamenta asociovaná s PRV kapsidami (tmavé tečky). Jaderný obal = ne. (b) Zvětšené a. Červené šipky značí vybrané interakce kapsid s filamenti. (c) Zvětšené a. Agregáty kapsid (plných i prázdných). (d) Pravděpodobně nezralé kapsidy asociované s filamenti. (e) Kapsidy interagují s filamenti na jejich koncích i uprostřed. (f) Snímek složený ze třiceti vrstev vzdálených 50 nm. (Feierbach et al. 2006)

Feierbach et al. dále pomocí konfokální mikroskopie ukázali, že se jedná o vlákna složená s F-aktinu (viz obr. 4). Jejich polarita odpovídala celkové polaritě buňky, k jejich tvorbě docházelo především na té straně jádra, která sousedí s Golgiho aparátem. Použitím rekombinantního PRV produkujícího hlavní kapsidový protein VP26 fúzovaný s GFP bylo možné pozorovat agregaci fluorescenčního VP26 do míst, kde pravděpodobně dochází ke skládání virových kapsid (GFP-VP26 foci, capsid assembly sites), a signifikantní kolokalizaci těchto agregátů s aktinovými filamenty (detekována fluorescenčně značeným faloidinem) (viz obr. 5). Aktinová vlákna se v jádrech infikovaných buněk objevila krátce před zformováním GFP-VP26 agregátů a pokud došlo k jejich rozrušení pomocí latrunculinu A, k agregaci GFP-VP26 vůbec nedošlo. To naznačuje, že filamentární aktin zde hraje roli v utváření a/nebo udržování těchto struktur. Pokud byl místo latrunculinu A použit jasplakinolid, který stabilizuje aktinová filamenta, k rozrušení GFP-VP26 domén nedošlo (ve skutečnosti jich naopak přibývalo) (viz obr. 6). Rápidní polymerizace aktinu tedy zřejmě k jejich tvorbě potřeba není (Feierbach et al. 2006).

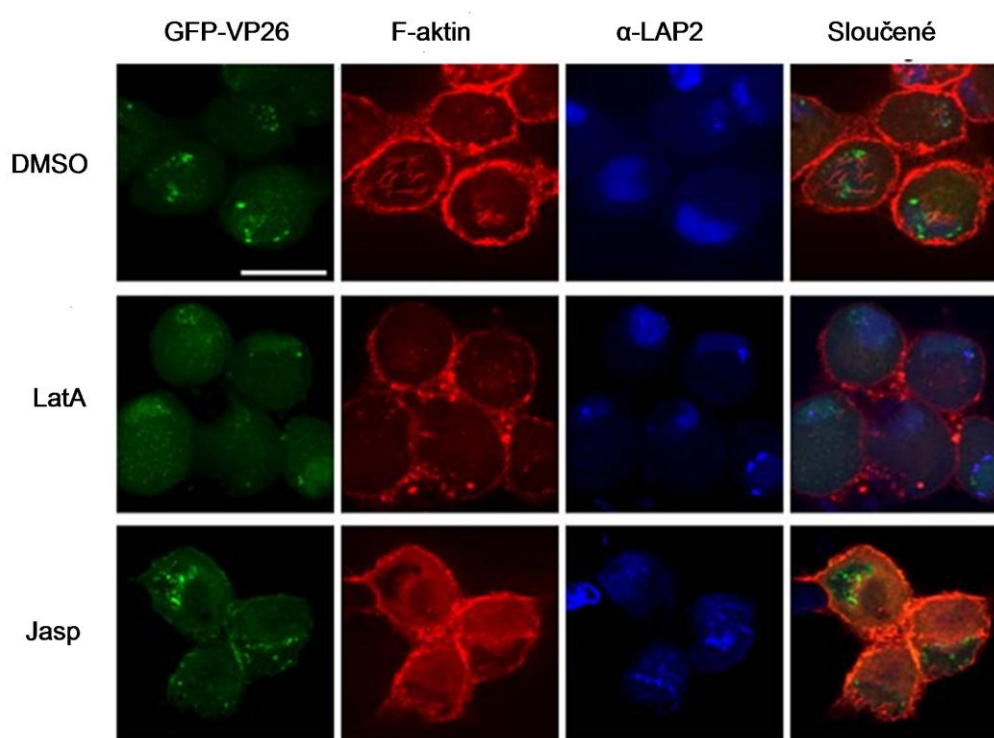


Obr. 4: Tvorba aktinových filament v jádrech neuronů infikovaných PRV. Snímky z konfokálního mikroskopu složené z pěti vrstev vzdálených 0,5 μm . α -LAP2-jaderný marker, s laminou asociovaný polypeptid. GFP-VP26 je vizualizován přímou fluorescencí. Aktin je značen fluorescenčním faloidinem. Měřítko = 10 μm . (Feierbach et al. 2006)

Závěry jiné práce naznačují, že se kapsidy herpes simplex viru 1 v jádrech infikovaných buněk pohybují aktivním transportem závislým na aktinu a myosinu (Forest, Barnard and Baines 2005). Feierbach et al. proto zkusili značit infikované buňky na jaderné myosiny a zjistili, že jaderný myosin Va silně kolokalizuje s GFP kapsidami a to zejména v GFP-VP26 agregátech (Feierbach et al. 2006).



Obr. 5: Kolokalizace GFP-VP26 s aktinovými filamenti (značena fluorescenčním faloidinem) 12h po infekci. Snímky z konfokálního mikroskopu, jen jedna rovina ostrosti. Měřítka = 10 μ m. (Feierbach et al. 2006)



Obr. 6: Účinek latrunculinu A (LatA), jasplakinolidu (Jasp) a DMSO (kontrola) na tvorbu jaderných aktinových filament a GFP-VP26 agregátů. Snímky z konfokálního mikroskopu složené ze čtyř vrstev vzdálených 0,5 μ m. α -LAP2-jaderný marker, polypeptid asociovaný s laminou. Aktin vizualizován fluorescenčním faloidinem. Měřítka = 20 μ m. (Feierbach et al. 2006)

Při infekci buněk se zablokovanou proteosyntézou k formaci jaderných aktinových filament nedochází, ale inhibitor virové replikace tvorbě filament nezabrání. Je-li k infekci použit virus ozářený UV (virová replikace i transkripce je tedy znemožněna), dojde k stejnému efektu jako v případě zablokované proteosyntézy. Alespoň jeden bezprostředně časný nebo časný virový protein je tedy nutný ke zformování jaderného F-aktinu (Feierbach et al. 2006).

K tvorbě jaderných aktinových filament dochází i v neuronech infikovaných HSV-1 a také u transformovaných prasečích epiteliálních ledvinových buněk při infekci PRV. Jedná se

tedy pravděpodobně o obecný mechanismus, který využívají všechny alfaherpesviry (Feierbach et al. 2006).

Shrnutí: Jaderná aktinová filamenta zřejmě hrají roli ve skládání virových kapsid a jejich transportu směrem k jaderné periferii. K indukci jejich tvorby je zapotřebí minimálně jeden bezprostředně časný nebo časný virový protein. Výsledky výše zmíněných prací naznačují model aktivního transportu virových kapsid podél aktinových filament využívajícího molekulární motor myosin Va (viz schéma 1).

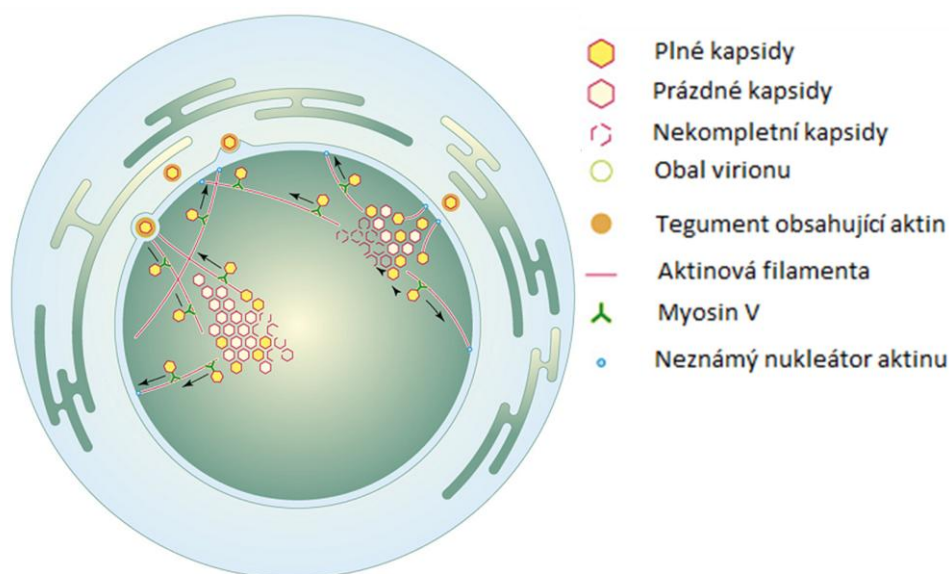


Schéma 1: Možný mechanismus využití jaderných aktinových filament u HSV-1. Formace replikačních kompartmentů, kde dochází mimo jiné ke skládání a plnění kapsid, je závislá na tvorbě jaderného F-aktinu. Viriony se pohybují směrem k jadernému obalu aktivním transportem závislým na aktinu a myosinu V. Aktin může být součástí tegumentu HSV-1 i jiných herpesvirů. Upraveno podle: Favoreel, Enquist and Feierbach 2007.

3.1.1.3 Role jaderného aktinu v morfologických změnách jader u buněk infikovaných HSV-1

Infekce herpes simplex virem 1 vyvolává dramatické změny v morfologii jader infikovaných buněk (viz kapitola 3.1.1.1). Spolu se vznikem replikačních kompartmentů, jejich zvětšováním a vzájemnou fúzí dochází k marginalizaci hostitelského chromatinu, jeho vytlačení na jadernou periferii, ale také k výraznému zvětšení jader (na dvojnásobek objemu) (Monier et al. 2000). Nakonec je rozvolněna jaderná lamina a viriony unikají z jádra (viz kapitola 3.2).

Při inkubaci buněk infikovaných HSV-1 s latrunculinem A se zvětšení jader a disperze hostitelského chromatinu na úkor replikačních kompartmentů projevuje mnohem méně než u buněk kontrolních a buněk inkubovaných s cytochalasinem D (obě drogy byly přidány do média 2 hodiny po infekci). Vzhledem k tomu, že latrunculin A váže monomerní G-aktin a inhibuje tak jeho možné funkce, je pravděpodobné, že za výše zmíněnými změnami stojí G-aktin a ne F-aktin, jehož rozrušení cytochalasinem D (který se váže specificky na rostoucí konec F-aktinu) změny v morfologii jader v podstatě neovlivnilo (Simpson-Holley et al. 2005). Jak je ale zmíněno výše, latrunculin A také destabilizuje jaderná aktinová filamenta (F-aktin) u buněk infikovaných PRV a zabraňuje tvorbě jaderných domén, kde dochází ke skládání virových kapsid (Feierbach et al. 2006). Navíc i u cytochalasinu D bylo ukázáno, že snižuje infektivitu PRV (Wong and Chen 1998). Přesnou roli monomerní, případně polymerní formy aktinu v této části životního cyklu alfaherpesvirů je tedy potřeba dále studovat.

Infekce HSV-1 také způsobuje destrukci jaderné laminy (viz kapitola 3.2). Ukazuje se ale, že sekvestrace G-aktinu latrunculinem A této destrukci nezabrání (Simpson-Holley et al. 2005). Mechanismus rozrušení jaderné laminy je tedy zřejmě na jaderném G-aktinu nezávislý.

Shrnutí: Jaderný aktin, pravděpodobně ve formě monomerního G-aktinu, je nezbytný pro maturaci replikačních kompartmentů, marginalizaci a disperzi hostitelského chromatinu a zvětšení jader u buněk infikovaných HSV-1.

3.1.1.4 Aktin může být součástí virionu herpesvirů

Ukazuje se, že aktin může být inkorporován do virionů pseudorabies viru (Wong and Chen 1998, del Rio, DeCoste and Enquist 2005), lidského cytomegaloviru (Varnum et al. 2004), myšího cytomegaloviru (Kattenhorn et al. 2004) i viru Kaposiho sarkomu (Bechtel, Winant and Ganem 2005, Zhu et al. 2005). Aktin je lokalizován pravděpodobně převážně v tegumentu virionu (del Rio et al. 2005), u PRV bylo prokázáno, že dokáže částečně nahradit hlavní tegumentový protein VP22 (del Rio et al. 2005). Vlákna podobná aktinu byla navíc pozorována ve virionu HSV-1. Zdálo se, že spojují tegument s membránovým obalem (Grünwald et al. 2003). Přestože je důkazů o přítomnosti aktinu ve virionech herpesvirů stále více, jeho funkce zde zůstává předmětem spekulací.

3.1.2 Interakce bakulovirů s jaderným aktinem

3.1.2.1 Bakuloviry

Bakuloviry jsou viry s dsDNA genomem infikující bezobratlé, především hmyz řádu *Lepidoptera*, *Hymenoptera* a *Diptera*. Unikátní vlastnost bakulovirů spočívá v produkci dvou morfologicky odlišných infekčních virových částic (viz obr. 7). „Budded“ virus (BV) vzniká pučením nukleokapsidy z cytoplasmatické membrány infikované buňky obsahující virové glykoproteiny. BV je zodpovědný za šíření viru mezi buňkami jedince a vyvolání systémové infekce. „Occlusion-derived“ virus (ODV) získává obal v jádře (pravděpodobně z invaginací jaderné membrány) a jednotlivé viriony jsou dále inkorporovány do mohutné parakrystalické proteinové matrix, tvořené proteinem polyhedrinem u nukleopolyhedrovirů (NPV) nebo granulinem u granulovirů (GV). ODV slouží k infekci dalších jedinců a je schopen dlouhé perzistence v prostředí mimo hostitelskou buňku.

ODV partikule u nukleopolyhedrovirů obsahuje více obalených virionů spojených polyhedrinem a má strukturu mnohostěnu. Podle toho, zda je v jednom membránovém obalu virionu jedna nebo více nukleokapsid, se nukleopolyhedroviry dále dělí na „single“ a „multiple“ nukleopolyhedroviry (SNPV, MNPV). ODV u granulovirů je tvořen jen jedním virionem v oválném obalu z granulinu.

Replikace, transkripce i morfogeneze kapsid bakulovirů probíhá v buněčném jádře. K replikaci virové DNA dochází v určitých intranukleárních doménách, které postupně rostou, až zformují tzv. virogenní stroma, které zabírá většinu jádra a marginalizuje hostitelský chromatin.

Základní charakteristiky bakulovirů jsou shrnuty v Encyclopedia of Life Sciences (Guarino 2005).

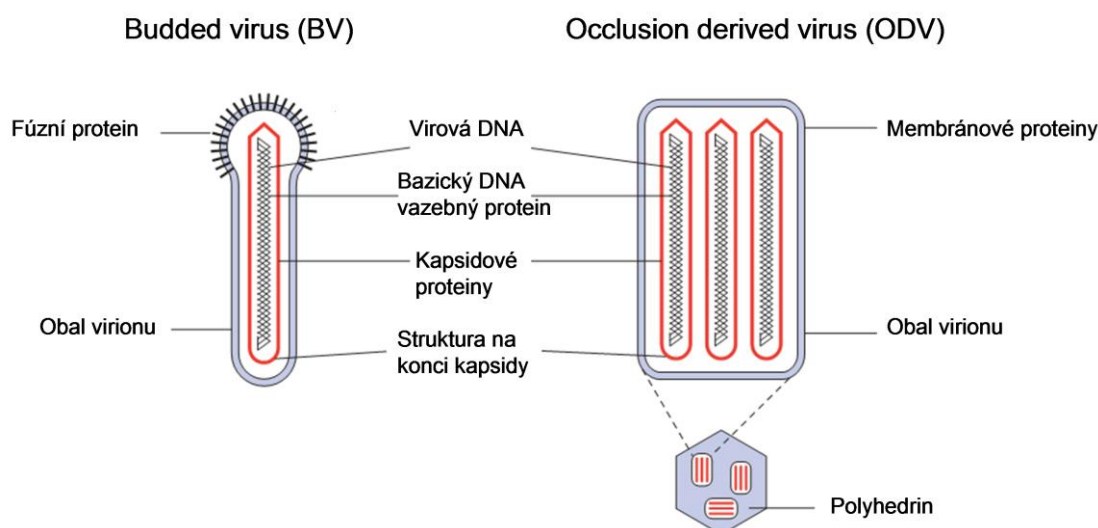
3.1.2.2 Jaderná aktinová filamenta jsou nezbytná pro morfogenezi nukleokapsid

Autographa californica MNPV a dalších nukleopolyhedrovirů

Už před více než dvaceti lety bylo zjištěno, že cytochalasin D inhibuje replikaci *Autographa californica* multiple nukleopolyhedroviru (AcMNPV) a to tím, že zamezuje správné tvorbě nukleokapsid v jádrech infikovaných buněk (Volkman, Goldsmith and Hess 1987, Hess, Goldsmith and Volkman 1989). Tyto výsledky naznačovaly, že se v jaderném procesu morfogeneze virových nukleokapsid uplatňuje F-aktin, což se také později potvrdilo (Charlton and Volkman 1991, Volkman et al. 1992, Ohkawa and Volkman 1999).

K tvorbě jaderných aktinových filament u buněk infikovaných AcMNPV dochází v pozdní fázi infekce (počínaje 12 hpi) (Charlton and Volkman 1991) a to především v oblasti jádra, která ohraničuje virogenní stroma (Charlton and Volkman 1991, Volkman et al. 1992) (viz obr. 8). Do této oblasti je také soustředěn hlavní kapsidový protein viru p39 (Charlton and Volkman 1991, Volkman et al. 1992). Pokusy s aktinem rezistentním vůči cytochalasinu D následně definitivně potvrdily, že inhibice správné morfogeneze nukleokapsid AcMNPV byla skutečně způsobena rozrušením jaderného F-aktinu (Ohkawa and Volkman 1999).

Volkman a Kasman se rovněž zaměřili i na jiné nukleopolyhedroviry a zjistili, že *Spodoptera frugiperda* MNPV, *Bombyx mori* NPV, *Orgyia pseudotsugata* MNPV, *Lymantria dispar* MNPV, *Anticarsia gemmatalis* MNPV a *Helicoverpa zea* SNPV nejsou schopny tvořit infekční potomstvo v přítomnosti cytochalasinu D nebo latrunculinu A (Kasman and Volkman 2000). Vzájemná nepřibuznost některých těchto virů ukazuje na konzervovaný mechanismus využití jaderného F-aktinu pro morfogenezi kapsid nukleopolyhedrovirů.

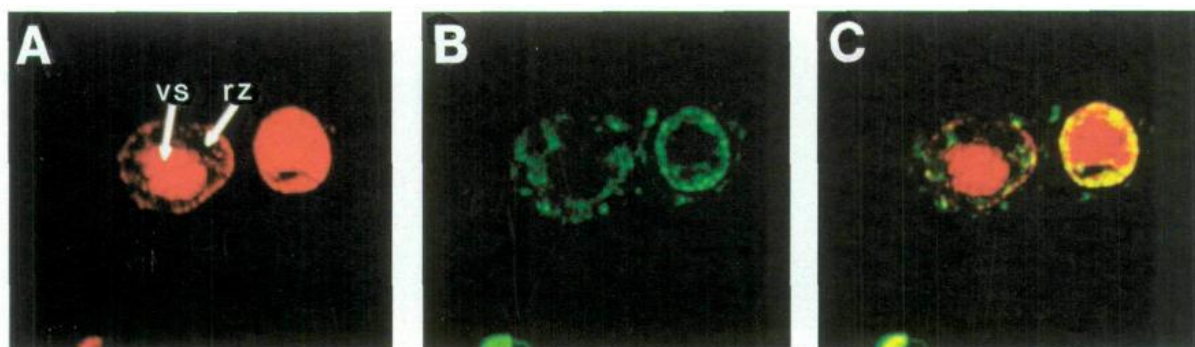


Obr. 7: Schématické znázornění struktury virionů bakulovirů (zde multiple nukleopolyhedroviru). Upraveno podle: Guarino 2005.

3.1.2.3 *Autographa californica* MNPV dokáže lokalizovat cytoplasmatický aktin do jádra buňky

Předpokladem zformování jaderných aktinových filament v pozdní fázi infekce AcMNPV (viz předchozí kapitola) je předchozí nahromadění dostatečného množství aktinových monomerů v jádře. K tomu dochází už v časně fázi infekce za účasti produktů šesti virových genů: ie-1, pe38, he65, Ac004, Ac102, a Ac152. Proteiny IE1 a PE38 jsou

bezprostředně časné (immediate-early) transkripční aktivátory, he65 kóduje opožděně časný (delayed-early) protein a produkty zbylých genů ještě nebyly charakterizovány. Produkt genu Ac152 je ale nejspíše transaktivátorem Ac102 a he65 (Ohkawa, Rowe and Volkman 2002). Expres těchto šesti genů v buňkách je dostačující pro lokalizaci G-aktinu v jádře, ale ne pro jeho polymeraci (Ohkawa et al. 2002).



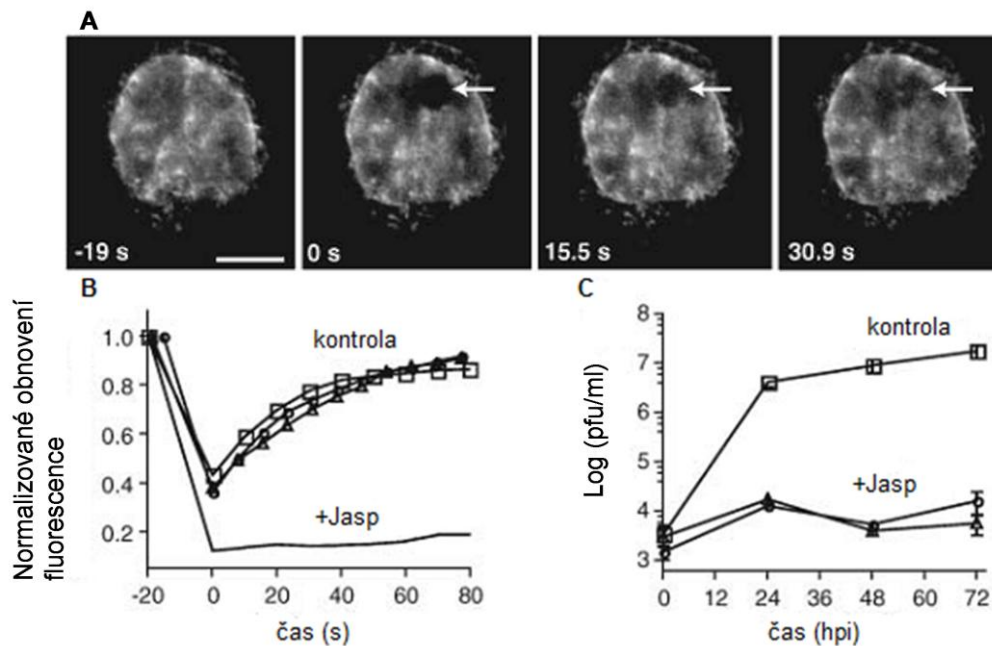
Obr. 8: Aktinová filamenta v jádrech buněk infikovaných AcMNPV (24 hpi). Snímky z konfokálního mikroskopu. (A) DNA značená propidium jodidem. Vs = virogenní stroma. Rz = „ring zone“, oblast mezi vs a marginalizovaným hostitelským chromatinem. (B) F-aktin značený FITC-faloidinem. (C) A a B sloučeno. Převzato z: Volkman et al. 1992.

3.1.2.4 Mechanismus polymerace jaderného aktinu u nukleopolyhedrovirů

Nukleokapsidy AcMNPV jsou schopné indukovat polymeraci aktinu *in vitro* (Lanier and Volkman 1998) i *in vivo* v časné fázi infekce po uvolnění z endosomu (Charlton and Volkman 1993). Lanier a Volkman také identifikovali dva aktin-vazebné kapsidové proteiny: p39 a p78/83 (Lanier and Volkman 1998).

Sledování kinetiky polymerace jaderného aktinu pomocí FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) ukázalo velkou dynamiku F-aktinu v jádrech infikovaných AcMNPV. Jaspilakinolid, který stabilizuje aktinová filamenta a brání jejich další polymeraci, jednak zabránil obnovení fluorescence při FRAP experimentech, ale také výrazně snížil infektivitu viru (viz obr. 9) (Goley et al. 2006). To znamená, že nejen tvorba jaderného F-aktinu, ale i jeho dynamická polymerace, hraje důležitou roli v životním cyklu AcMNPV. Goley et al. dále zjistili, že za nukleaci jaderného aktinu je zodpovědný komplex Arp2/3 (Actin-related protein 2/3, běžný hostitelský nukleátor aktinu), který je během infekce rekrutován do jádra a aktivován virovým kapsidovým proteinem p78/83 (Goley et al. 2006). Protein p78/83 nukleopolyhedrovirů obsahuje několik vysoce konzervovaných sekvencí. Jedná se o homology domén typických pro proteinovou rodinu WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), konkrétně o oblast bohatou na prolin (prolin-rich region), doménu „WASP-homology 2“

vzájící G-aktin a oblast „connector and acidic region“, která váže Arp2/3 komplex (Machesky, Insall and Volkman 2001). Úkolem WASP proteinů a jím podobných aktivátorů nukleace aktinu (nucleation-promoting factors) je aktivace Arp2/3 a následná nukleace aktinových filament. Protein p78/83 tedy zřejmě dokáže mimikovat tento normální buněčný proces (Goley et al. 2006).



Obr. 9: (A) FRAP: Obnovení fluorescence EGFP-aktinu v místě vysvícení (šipka) v závislosti na čase. (B) Graf obnovení (recovery) fluorescence v přítomnosti jasplakinolidu (24 hpi, přidáno 1 μ M 20 hpi) a v kontrolních buňkách (trojúhelníky – 12 hpi, kruhy – 18 hpi, čtverce – 24 hpi). (C) Graf replikace viru v přítomnosti jasplakinolidu (přidán 1 μ M: trojúhelníky – 0 hpi, kruhy – 15 hpi) a v kontrolních buňkách. Pfu = plaque-forming units. Upraveno podle: Goley et al. 2006.

Pro tvorbu jaderného F-aktinu a správnou tvorbu nukleokapsid je esenciální i virový kapsidový protein C42, který zprostředkuje translokaci p78/83 do jádra díky svému jadernému lokalizačnímu signálu (Wang et al. 2008). C42 se však účastní polymerace jaderného aktinu i přímo, jeho absence zabrání tvorbě jaderného F-aktinu a správné morfogenezi nukleokapsid, i když je jaderná lokalizace p78/83 zajištěna uměle (Li et al. 2010).

Výše uvedená zjištění platí pro *Autographa californica* MNPV, stejný mechanismus polymerace aktinu v jádře byl nicméně popsán i u *Helicoverpa armigera* MNPV (Wang et al. 2007) a je tedy možné, že ho využívají všechny nukleopolyhedroviry. Tomu napovídá i vysoká konzervovanost domén typických pro WASP proteiny (Machesky et al. 2001).

Nedávno byl popsán i další protein *Autographa californica* MNPV, který interaguje s hostitelským jaderným aktinem, VP80 (Marek et al. 2011a). Protein VP80 asociuje s virovými nukleokapsidami i s aktinovými filamenty, která spojují virogenní stroma s jadernou periferií (Marek et al. 2011a). Navíc je nezbytný pro export kapsid AcMNPV z jádra (Marek et al. 2011b). Marek a kolegové dále zjistili, že export kapsid závisí také na aktinu a myosinu. To spolu s faktem, že VP80 sdílí sekvenční homologie s paramyosinovou proteinovou rodinou, ukazuje na možné využití akto-myosinového komplexu v transportu virových kapsid z jádra (Marek et al. 2011a).

Shrnutí: Polymerace jaderného aktinu je nutná pro správnou tvorbu virových kapsid nukleopolyhedrovirů. Nejprve dochází vlivem časných virových proteinů k hromadění G-aktinu v jádře, později v pozdní fázi infekce je aktin polymerizován. Polymerace jaderného aktinu je dynamická a jako nukleátor zde slouží hostitelský Arp2/3 komplex, který je aktivován virovým kapsidovým proteinem p78/83, homologem WASP. Přímou i nepřímou se na tvorbě jaderných aktinových filament podílí i další kapsidový protein, C42. Jaderný F-aktin dále interaguje s virovým proteinem VP80 a možná tak zajišťuje transport nukleokapsid z jádra.

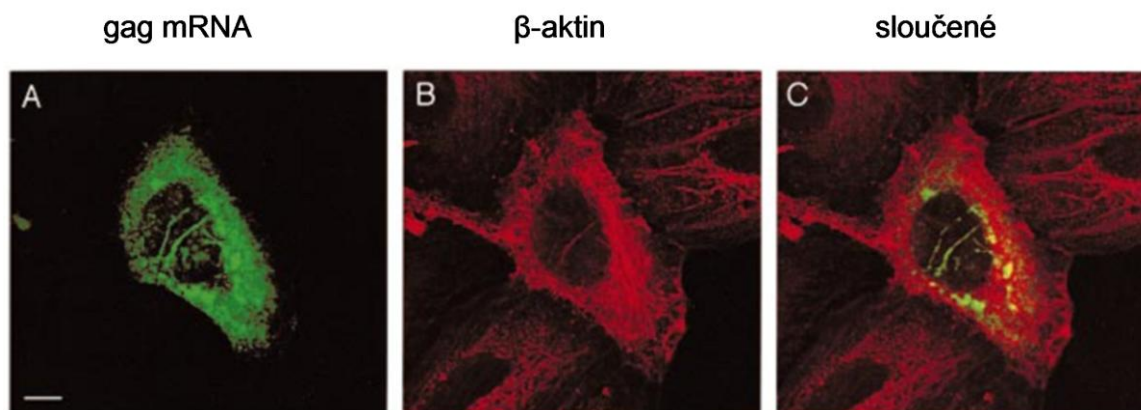
3.1.3 Interakce retrovirů s jaderným aktinem

Kromě herpesvirů a bakulovirů využívají hostitelský jaderný aktin i některé retroviry. Doposud byly identifikovány dva zástupci čeledi *Retroviridae*, jejichž úspěšná replikace závisí na přítomnosti aktinu v jádře. Prvním je virus lidského imunodeficientu typu 1 (HIV-1) z rodu lentivirus, druhým Mason-Pfizer monkey virus (MPMV), patřící mezi betaretroviry. Oba viry potřebují jaderný aktin k transportu svých nesestřížených mRNA z jádra do cytoplasmy (Kimura et al. 2000, Hofmann et al. 2001).

Kimura et al. pozorovali vznik svazků aktinových filament v jádrech transfekovaných HeLa buněk, které exprimovaly virové RNA. Tyto svazky protínající jádro a směřující k jadernému obalu kolokalizovaly s gag mRNA (obr. 10), Rev proteinem, exportinem 1 a s GTPasou Ran. Rozrušení těchto aktinových svazků latrunculinem B inhibovalo nukleocytoplasmický transport gag mRNA, ale nikoliv kompletně sestřížené tat/rev mRNA nebo buněčné mRNA pro glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (Kimura et al. 2000). Rev je virový protein zodpovědný za transport nesestřížených a částečně sestřížených mRNA do cytoplasmy. Ve své N-koncové oblasti obsahuje sekvenci, která slouží jako jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal, NLS) a zároveň specificky rozeznává tzv. Rev response

element (RRE), vlásečkovou strukturu přítomnou na nesestřižených virových mRNA. Na C-konci Rev proteinu se nachází sekvence jaderného exportního signálu (nuclear export signal, NES), pomocí níž interaguje s exportinem 1, který spolu s GTPasou Ran zprostředkuje translokaci Rev i s navázanou mRNA přes komplex jaderného póru do cytoplasmy (mRNA transport pomocí Rev shrnut například v: Cullen 2003).

Dalším esenciálním faktorem pro „Rev-dependentní“ export mRNA HIV-1 do cytoplasmy oocytů *Xenopus laevis* je translační iniciační faktor eIF-5A, který interaguje přímo s Rev i exportinem 1 (Hofmann et al. 2001). Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) nekóduje žádný protein podobný Rev a transport nesestřižených mRNA závisí na hostitelských faktorech, rozeznávajících RNA strukturu zvanou konstitutivní transportní element (Constitutive transport element, CTE) (shrnut v: Cullen 2003). Export CTE-RNA na eIF-5A nezávisí (Hofmann et al. 2001).



Obr. 10: Kolokalizace gag mRNA-*rev* a β -aktinu v transfekovaných HeLa buňkách exprimujících gag mRNA a *Rev* fúzovaný s HA epitopem. Snímky z konfokálního mikroskopu. β -aktin detekován monoklonální protilátkou. Gag mRNA detekována specifickou anti-sense próbou (RNA-FISH). Měřítka = 10 μ m. Převzato z: Kimura et al. 2000.

Hofmann et al. potvrdili nezbytnost jaderného aktinu pro „Rev-dependentní“ (HIV-1) i „Rev-independentní“ (MPMV) transport nesestřižených retrovirových mRNA při mikroinjekčních experimentech v oocytech *X. laevis* a Vero buňkách. Podobné výsledky byly překvapivě získány i pro hostitelský protein PKI (Protein kinase inhibitor) s vlastním NES. V přítomnosti latrunculinu B (váže aktinové monomery) došlo k zablokování tohoto transportu, ale při použití swinholidu A (dezintegruje aktinová filamenta, stabilizuje aktinové dimery) nebyl nukleocytoplasmický transport ovlivněn (Hofmann et al. 2001). Z toho autoři vyvozují, že aktin zde funguje ve své monomerní (nebo jiné netradiční) formě a nikoliv jako F-aktin. To částečně odporuje výsledkům získaných Kimurou et al., kteří rovněž identifikovali jaderný

aktin jako faktor nezbytný pro export gag mRNA z jádra, ale pozorovali jej ve formě svazků filament (značitelných fluorescenčním faloidinem) (Kimura et al. 2000). Zde je nutné si ovšem uvědomit, že účinky těchto inhibitorů bývají často komplexní a interpretace experimentů s jejich použitím není snadná. Pro objasnění přesného mechanismu funkce jaderného aktinu v transportu nesestřižených retrovirových mRNA si proto musíme počkat na další práce.

Shrnutí: Jaderný aktin (zatím není úplně jasné v jaké formě) se podílí na transportu nesestřižených nebo neúplně sestřižených mRNA retrovirů z jádra do cytoplasmy. Ačkoliv byl tento jev dosud popsán jen u dvou zástupců dvou rodů – HIV-1 (lentivirus) a MPMV (betaretrovirus), je pravděpodobné, že se jedná o obecně používaný mechanismus. Vzhledem k tomu, že inhibitor protein kinázy (PKI) potřebuje ke svému exportu z jádra jaderný aktin také, je možné, že si retroviry pro své potřeby adaptovaly již existující způsob buněčného transportu mezi jádrem a cytoplasmou.

3.2 Interakce virů s jadernými laminy

3.2.1 Interakce herpesvirů s jadernými laminy

Vzhledem k poměrně značným rozměrům nukleokapsid herpesvirů (115-130 nm), představuje jaderný obal významnou překážku na jejich cestě ven z buněčného jádra. Jaderným pórem mohou být transportovány molekuly do průměru cca 39 nm (Panté and Kann 2002) a velikost fenestrací v jaderné lamině se pravděpodobně pohybuje okolo 15 nm (Goldberg et al. 2008). Aby došlo ke zdárnému uvolnění virových nukleokapsid do cytoplasmy, musí tedy nejprve dojít buď ke zvětšení jaderných pórů, nebo k takovým změnám ve struktuře jaderné laminy, které by umožnily pučení nukleokapsid přes vnitřní jadernou membránu do perinukleárního prostoru. V současnosti je široce přijímána hypotéza „envelopment-deenvelopment-reenvelopment“ (tj. obalení, ztráta obalu a znouobalení), podle které dochází k pučení herpesvirových nukleokapsid přes vnitřní jadernou membránu do perinukleárního prostoru. Tyto primárně obalené viriony následně fúzí s vnější jadernou membránou a neobalené nukleokapsidy jsou uvolněny do cytoplasmy, kde získávají nový obal odvozený od membrán Golgiho aparátu nebo endoplasmatického retikula (Skepper et al. 2001, Nagel et al. 2008). Tento model ovšem předpokládá, že herpesviry indukují přestavbu nebo rozrušení jaderné laminy, která by za normálních okolností přímému kontaktu nukleokapsid s vnitřní jadernou membránou zabránila.

3.2.2 Při infekci herpesviru dochází k rozrušení jaderné laminy

Řada prací potvrzuje, že herpesviry skutečně vyvolávají změny ve struktuře jaderné laminy. Herpes simplex virus 1 (Scott and O'Hare 2001, Simpson-Holley et al. 2004, Simpson-Holley et al. 2005, Reynolds et al. 2004, Park and Baines 2006), herpes simplex virus 2 (Cano-Monreal et al. 2009), myší cytomegalovirus (Muranyi et al. 2002), lidský cytomegalovirus (Marschall et al. 2005, Camozzi et al. 2008, Milbradt et al. 2009, Hamirally et al. 2009, Milbradt et al. 2010) a virus Epsteinovy a Barrovy (Lee et al. 2008) využívají podobné mechanismy k rozrušení jaderné laminy a uvolnění virionů z jádra. Tyto mechanismy závisí na virových i hostitelských faktorech a budou podrobně rozebrány na příkladu herpes simplex viru 1 a stručně popsány u dalších herpesvirů.

3.2.3 Mechanismy rozrušení jaderné laminy: Herpes simplex virus 1

Herpes simplex virus 1 využívá své i hostitelské proteiny k indukci rozpadu jaderné laminy. Nejprve budou probrány dvě skupiny virem kódovaných proteinů, které se přímo účastní dezintegrace jaderné laminy: proteiny asociované s jadernou membránou a virové kinázy. V kapitole 3.2.3.3 pak bude představen jeden hostitelský protein využívaný virem k rozrušení laminy, protein kináza C.

3.2.3.1 Virové proteiny asociované s jadernou membránou

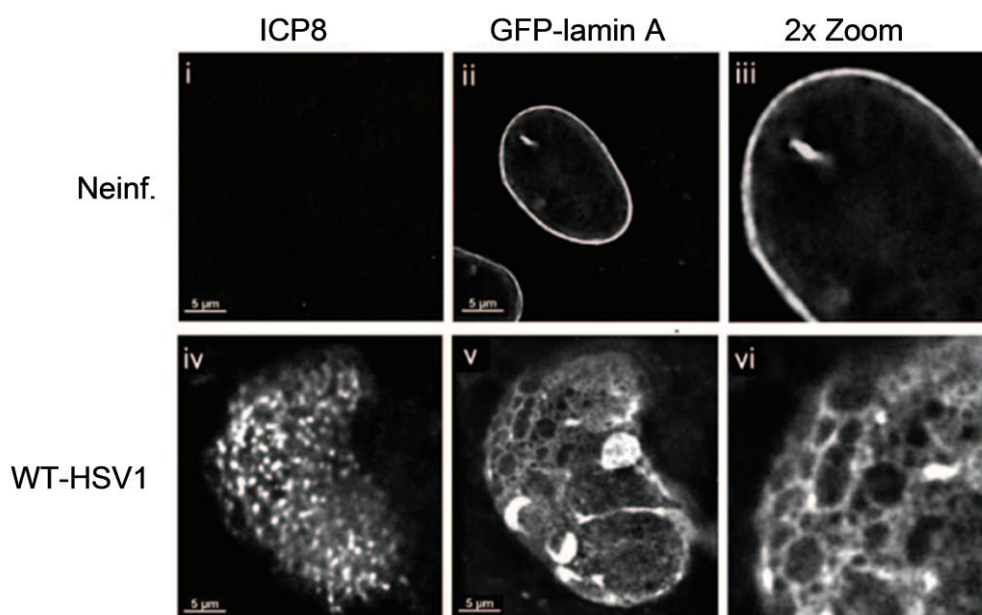
Scott a O'Hare popsali změny ve struktuře jaderné laminy vyvolané infekcí HSV-1. U infikovaných buněk pozorovali odlišné fluorescenční profily jaderných laminů a lamin B receptoru (LBR, protein vnitřní jaderné membrány interagující s laminem B), které naznačovaly řidnutí a částečný rozpad jaderné laminy (Scott and O'Hare 2001). Autoři získali tyto výsledky pozorováním živých buněk produkujících proteiny LBR, lamin A a lamin B2 fúzované s GFP a potvrdili je i metodou nepřímé imunofluorescence, kde značily laminy A/C, B1 a B2 pomocí protilátek. Navíc zjistili, že v infikovaných buňkách roste rychlost difúze LBR ve vnitřní jaderné membráně a zvyšuje se i rozpustnost laminu A. Infekce HSV-1 také vyvolala celkové snížení obsahu laminů v buňkách (především laminu A/C) (Scott and O'Hare 2001). Tyto výsledky mohou znamenat, že HSV-1 indukuje rozrušení jaderné laminy.

pU_L34 je virem kódovaný transmembránový protein nutný k primárnímu obalení virionů (Roller et al. 2000), pU_L31 je fosfoprotein asociovaný s jadernou matrix (Chang and Roizman 1993). Oba proteiny spolu tvoří komplex, který asociuje s vnitřní jadernou

membránou (Reynolds et al. 2001, Reynolds et al. 2002, Liang and Baines 2005). K této lokalizaci proteinů pU_L34 a pU_L31 dochází, jen jsou-li exprimovány současně (při infekci mutantním virem s delecí genu U_L34 se pU_L31 nachází v intranukleárních doménách a částečně v cytoplasmě, při infekci mutantním virem s deletovaným genem U_L31 se pU_L34 nachází nejen v blízkosti jaderného obalu, ale i v replikačních kompartmentech a v cytoplasmě) (Reynolds et al. 2001, Reynolds et al. 2002). Koexprese genů U_L34 a U_L31 sama postačuje k lokalizaci pU_L34 a pU_L31 do jaderného obalu (Reynolds et al. 2001). Pro rovnoměrné rozmístění pU_L34/pU_L31 komplexů podél vnitřní jaderné membrány je nezbytná přítomnost virové kinázy pU_S3, při její absenci dochází k asociaci těchto proteinů s invaginacemi jaderné membrány, které obsahují shluky primárně obalených virionů (Reynolds et al. 2001, Reynolds et al. 2002). Správná lokalizace pU_L34 však také závisí i na přítomnosti samotného laminu A/C v buňkách (Mou et al. 2008).

Kromě role v primárním obalení virionů (Roller et al. 2000, Reynolds et al. 2002, Reynolds et al. 2001), je komplex proteinů pU_L31 a pU_L34 zodpovědný za rozrušení jaderné laminy a uvolnění virionů z jádra. Simpson-Holley et al. ukázali, že při infekci HSV-1 dochází spolu se zráním replikačních kompartmentů ke změnám v imunoreaktivitě laminu A/C a s laminou asociovaného polypeptidu 2 (LAP2), které ukazují na možný rozpad laminy. Mutantní viry s delecí U_L34 nebo U_L31 nebyly schopny tyto změny vyvolat, což naznačuje esenciální roli obou proteinů v tomto procesu (Simpson-Holley et al. 2004). To potvrzují i zjištění, že oba proteiny přímo váží lamin A/C *in vitro* a zvýšená produkce jednoho i druhého vede k částečné relokizaci laminu A/C z oblasti jaderného obalu (Reynolds et al. 2004).

Reynolds a další sledovali vliv infekce HSV-1 na imunoreaktivitu laminu A/C, který značili třemi různými protilátkami. Při použití monoklonální protilátky proti koncové části laminu A/C došlo v infikovaných buňkách k výrazné redukci značení laminu, která vyžadovala přítomnost proteinů pU_L34 i pU_L31. Intenzita značení polyklonální protilátkou proti epitopům střední části laminu A/C se při infekci také snížila, ale tentokrát i za absence pU_L31 (nikoliv pU_L34). U další polyklonální protilátky však autoři překvapivě nezaznamenaly žádné změny ve značení laminu A/C mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami. Z toho vyvozují, že pozorované snížení imunoreaktivity laminu A/C během infekce HSV-1 je důsledkem maskování epitopů a tedy spíše konformačních změn než rozrušení jaderné laminy (Reynolds et al. 2004). K perforaci a rozpadu jaderné laminy vlivem infekce HSV-1 však zřejmě dochází také, jak ukázaly metody vizualizace nezávislé na protilátkách (Simpson-Holley et al. 2005) (viz obr. 11).



Obr. 11: Vliv infekce HSV-1 na strukturu jaderné laminy (16 hpi). Snímky z fluorescenční mikroskopie. ICP8 slouží jako marker infekce, změny ve struktuře laminy vizualizovány pomocí GFP-laminu A, WT-HSV1 – divoký typ HSV-1, Neinf. – kontrolní neinfikované buňky. (Simpson-Holley et al. 2005)

Proteiny pU_L34 a pU_L31 jsou nepostradatelné nejen pro disrupci laminu A/C, ale i laminu B (Bjerke and Roller 2006) a také pro zvětšení jader, které infekce HSV-1 indukuje (Simpson-Holley et al. 2005).

3.2.3.2 Virové kinázy

Virem kódovaná serin/threoninová kináza pU_S3 kolokalizuje s proteiny pU_L34 a pU_L31 na jaderné membráně a asociuje i s perinukleárními viriony v infikovaných buňkách (Reynolds et al. 2002). pU_S3 je schopna fosforylovat protein pU_L34 (Ryckman and Roller 2004) i pU_L31 (Mou, Wills and Baines 2009) a její aktivita je důležitá pro rovnoměrnou lokalizaci pU_L34/pU_L31 proteinového komplexu podél vnitřní jaderné membrány (Reynolds et al. 2001, Reynolds et al. 2002). Při její delecii nebo inaktivaci její katalytické činnosti dochází k hromadění primárně obalených virionů v invaginacích perinukleárního prostoru do nukleoplasmu. V těchto místech jsou koncentrovány také pU_L34, pU_L31 a pU_S3 (katalyticky neaktivní) a dochází zde k velkým perforacím laminy v důsledku narušení struktur laminu A/C (Reynolds et al. 2002, Bjerke and Roller 2006, Mou, Forest and Baines 2007). Zdá se, že tento defekt pravděpodobně spočívá v inhibici fosforylace pU_L31 (Mou et al. 2009). Delece U_S3 také vede ke snížení efektivity virové replikace v některých buněčných typech (Ryckman and Roller 2004, Reynolds et al. 2002).

Je překvapivé, že exprese samotného genu pro pU_S3 kinázu nebo pro pU_L34 vede k dramatickému rozpadu jaderné laminy, ale koexprese těchto genů vyvolá destrukci výrazně menšího rozsahu (Bjerke and Roller 2006). To naznačuje, že zde funguje vzájemná negativní regulace těchto dvou proteinů.

Kromě nepřímé role v indukci rozpadu jaderné laminy, která spočívá v regulaci aktivity proteinů pU_L34 a pU_L31 jejich fosforylací, bylo ukázáno, že pU_S3 přímo fosforyluje lamin A/C na více místech *in vitro* a *in vivo* (Mou et al. 2007). Přímou účast této kinázy na rozrušení laminů potvrzuje i fakt, že přítomnost pU_S3 zvyšuje rozpustnost laminu A/C (Mou et al. 2007). Navíc produkce pU_S3 v buňkách způsobuje disrupci jaderných laminů (Bjerke and Roller 2006), zde ale překvapivě není zapotřebí její kinázová aktivita. Je tedy možné, že pU_S3 dokáže vyvolat rozrušení laminy ještě nějakým jiným mechanismem, stejně tak dobře se ale může jednat o artefakt způsobený umělou nadprodukcí tohoto proteinu v buňkách.

Během infekce HSV-1 dochází nejen k změnám ve struktuře jaderné laminy jako takové, ale i s ní asociovaných proteinů vnitřní jaderné membrány jako je lamin B receptor (Scott and O'Hare 2001) a s laminou asociovaný polypeptid 2 (Simpson-Holley et al. 2004). Dalším takovým proteinem je emerín, který interaguje mimo jiné s laminen A/C a je zodpovědný za strukturní integritu jaderné laminy. Infekce HSV-1 vede k delokalizaci, zvýšené mobilitě a fosforylaci emerínu, a to pravděpodobně virovou kinázou pU_S3 a hostitelskou protein kinázou Cδ (nebo spíše jinou kinázou senzitivní k rottlerinu – viz další kapitola) (Morris, Hofemeister and O'Hare 2007, Leach et al. 2007, Leach and Roller 2010). K těmto změnám je zapotřebí i přítomnost pU_L34, který je sám schopen emerín vázat (Leach et al. 2007).

Další kináza Herpes simplex viru 1, která se zúčastní dezintegrace jaderné laminy, je produktem genu U_L13. Jedná se o serin/threoninovou kinázu, která je konzervována mezi herpesviry. Kináza pU_L13 je schopná fosforylovat pU_S3 a její delece vede k podobnému fenotypu jako delece U_S3, tj. změna lokalizace proteinů pU_L34, pU_L31 na vnitřní jaderné membráně (Kato et al. 2006). Není však jasné, zda pU_L13 ovlivňuje lokalizaci komplexu pU_L34/pU_L31 a tedy míru rozpadu laminy přímo nebo nepřímo prostřednictvím fosforylace pU_S3. Za zmínku zde také stojí, že pU_L13 Herpes simplex viru 2 přímo fosforyluje jaderné laminy a způsobuje jejich redistribuci (Cano-Monreal et al. 2009).

3.2.3.3 Hostitelské faktory: protein kináza C

Během infekce Herpes simplex viru 1 dochází k hromadění hostitelské protein kinázy C (PKC) u jaderného obalu (Park and Baines 2006). Tato relokalizace PKC nastává mezi osmou a dvanáctou hodinou po infekci a závisí na přítomnosti komplexu pUL34/pUL31 na jaderném obalu (Park and Baines 2006). Virová kináza pUS3 je pak zodpovědná za její rovnoměrnou distribuci podél obalu jádra, protože stejným způsobem ovlivňuje i lokalizaci samotného pUL34/pUL31 komplexu (viz předchozí kapitola). Dvě izoformy protein kinázy C – PKC α a PKC δ , takto v průběhu infekce relokalizovány, fosforylují lamin B (Park and Baines 2006).

Leach a Roller podali důkaz, že PKC má zásadní funkci v životním cyklu viru. Inhibice všech izoform PKC univerzálním inhibítozem vedla k výraznému snížení replikace viru a hromadění virionů v jádrech, ale i celkovému snížení počtu virových kapsid v infikovaných buňkách. Na druhou stranu specifická inhibice konvenčních PKC (PKC α) ani PKC δ replikaci neinhibovala (Leach and Roller 2010). To ukazuje buď na redundanci funkce těchto izoform nebo na zapojení jiných forem PKC. Tito autoři také překvapivě zjistili, že inhibice všech izoform PKC ani specifické snížení aktivity PKC δ (pomocí exprese dominantně negativní mutanty) nevede ke snížení hyperfosforylace emerinu (Leach and Roller 2010). Závěry zmíněné v předchozí kapitole byly založené na inhibici PKC δ rottlerinem, který skutečně částečně hyperfosforylaci emerinu zabrání (Leach et al. 2007). Nové poznatky však roli PKC δ v tomto procesu zpochybňují a ukazují na zapojení jiné k rottlerinu citlivé kinázy než PKC (Leach and Roller 2010).

3.2.3.4 Shrnutí mechanismů disrupce jaderné laminy virem HSV-1

Herpes simplex virus 1 vyvolává změny ve struktuře jaderné laminy. Ukazuje se, že celý proces je založen na složité vzájemné interakci virových a buněčných faktorů. Komplex virem kódovaných proteinů pUL34 a pUL31 asociuje s vnitřní jadernou membránou a je schopen indukovat změny v jaderné lamině sám o sobě. Navíc dokáže do oblasti jaderného obalu rekrutovat hostitelskou protein kinázu C, která fosforyluje lamin B. Virem kódované kinázy pUS3 a pUL13 jednak regulují funkce pUL34/pUL31 komplexu i sebe navzájem, ale pUS3 je schopna přímo fosforylovat lamin A/C i emerin. Výše zmíněné děje a interakce jsou znázorněny na schématu 2.

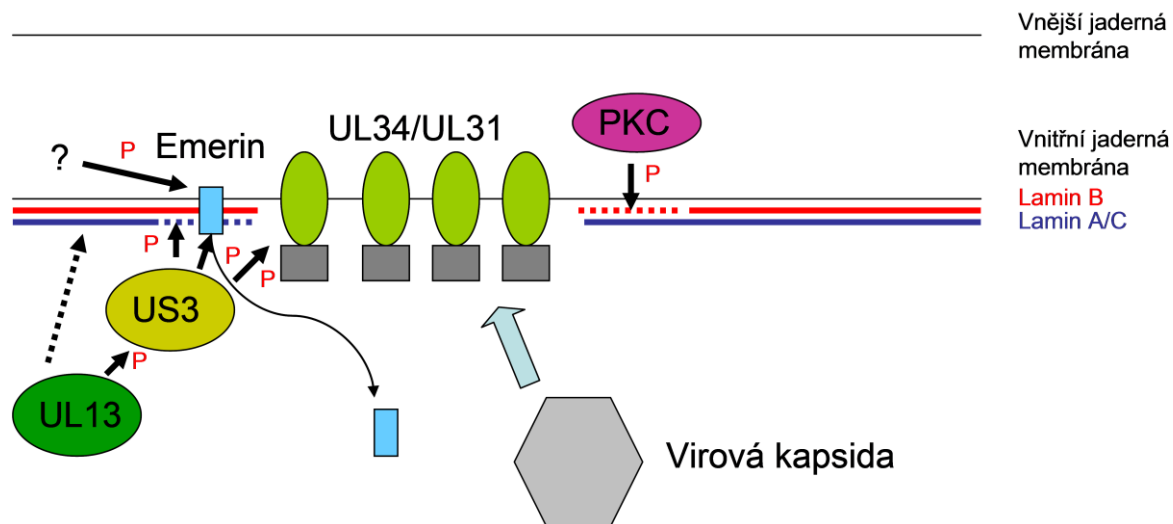


Schéma 2: Vzájemné interakce virových a buněčných faktorů při dezintegraci jaderné laminy u HSV-1. P značí fosforylaci, plná šipka prokázanou interakci, přerušovaná šipka předpokládanou interakci (prokázáno u HSV-2), ?- označuje zatím neznámou buněčnou kinázu, modrá šipka naznačuje pučení virové kapsidy do perinukleárního prostoru. (vlastní schéma)

3.2.4 Mechanismy rozrušení jaderné laminy: ostatní herpesviry

Jednotlivé druhy herpesvirů sdílí navzájem značnou míru homologie, co se mechanismů disrupce jaderné laminy týká. Dvojice proteinů vnitřní jaderné membrány homologní s pUL34, pUL31 herpes simplex viru 1 byly popsány i u herpes simplex viru 2 (Shiba et al. 2000, Yamauchi et al. 2001), pseudorabies viru (Klupp, Granzow and Mettenleiter 2000, Fuchs et al. 2002), lidského cytomegaloviru (Camozzi et al. 2008), myšího cytomegaloviru (Muranyi et al. 2002) i viru Epstein a Barrové (Lake and Hutt-Fletcher 2004, Farina et al. 2005, Gonnella et al. 2005). Tyto proteiny jsou stejně jako u HSV-1 důležité pro primární obalení virionů a jejich uvolnění z jádra. Přímá role ve změnách struktury laminy byla prokázána u proteinů pUL50 a pUL53 lidského cytomegaloviru a to včetně relokalizace protein kinázy C (Milbradt, Auerochs and Marschall 2007, Milbradt et al. 2009, Camozzi et al. 2008). Podobně proteiny M50/p35 a M53/p38 myšího cytomegaloviru rekrutují PKC do oblasti jaderného obalu (Muranyi et al. 2002). K interakci s laminem B dochází i v případě BFLF2 a BFRF1 viru Epstein a Barrové (Gonnella et al. 2005).

Homologii s HSV-1 nenacházíme jen u výše zmíněných proteinů, ale i ve funkci virových kináz. Homology UL13 HSV-1 (tzv. konzervované herpesvirové kinázy) se na rozrušení jaderné laminy podílejí u HSV-2, kde pUL13 přímo fosforyluje jaderné laminy (Cano-Monreal et al. 2009), podobně funguje i kináza pUL97 lidského cytomegaloviru (Marschall et al. 2005, Hamirally et al. 2009, Prichard 2009, Milbradt et al. 2009, Milbradt et

al. 2010) a BGLF4 u EBV (Lee et al. 2008). Zajímavé je, že u pU_L97 a BGLF4 se pravděpodobně jedná o napodobení aktivity buněčné kinázy Cdc2, která je zodpovědná za rozpad laminy během mitózy (Hamirally et al. 2009, Lee et al. 2008). Alfaherpesviry kódují i homology kinázy U_S3 a i v tomto případě lze nalézt podobné mechanismy interakcí – například mezi výše podrobně popisovaným HSV-1 a pseudorabies virem, kde pU_S3 také ovlivňuje lokalizaci pU_L34 (Klupp, Granzow and Mettenleiter 2001).

Tyto poznatky, přestože jsou neúplné, ukazují na značnou podobnost způsobů, jakými jednotlivé herpesviry docilují rozpadu jaderné laminy. Konzervovanost těchto mechanismů i mezi evolučně vzdálenějšími viry potom potvrzuje, že překonání bariéry jaderné laminy je esenciální krok v životním cyklu herpesvirů.

3.3 Další interakce virů s jaderným cytoskeletem

Herpes simplex virus 1 interaguje s jaderným aktinem (kapitola 3.1.1), laminy (kapitola 3.2.1) a zásadně mění morfologii jader infikovaných buněk (kapitoly 3.1.1.1 a 3.1.1.3). Kromě toho dokáže také rozrušit nukleoskelet vizualizovatelný fúzním proteinem GFP-Cdc14B (Simpson-Holley et al. 2005). Cdc14B je fosfatáza účastnící se regulací buněčného cyklu, která může v interfázi lokalizovat do intranukleárních filament spojujících jádérka s jadernou periferií a často končících v blízkosti jaderných pórů (Nalepa and Harper 2004). Tato filamenta mají asi 7 nm v průměru a jejich formace je závislá na aktinu (Nalepa and Harper 2004). V průběhu infekce HSV-1 dochází k rozrušení těchto vláken a GFP-Cdc14B vytváří v jádře bodové shluky (Simpson-Holley et al. 2005).

Virus HIV-1 potřebuje jaderný aktin k exportu svých nesestřížených mRNA (viz kapitola 3.1.3), ale existují i důkazy o jeho interakcích s jadernou laminou. Virem kódovaný protein Vpr indukuje vznik trhlin v jaderném obalu, které odpovídají místům s defekty ve struktuře jaderné laminy (de Noronha et al. 2001). Tyto trhliny vedou k promíchání cytoplasmatického a jaderného obsahu včetně regulátorů buněčného cyklu. Autoři z toho proto vyvozují, že tato poškození vedou ve svém důsledku k zastavení buněčného cyklu v G2 fázi, které Vpr vyvolává (de Noronha et al. 2001).

4 Závěr

Přestože je jaderný cytoskelet sám o sobě zatím poměrně málo probádanou součástí buňky, máme již, dle mého názoru, dostatek důkazů o jeho interakcích s několika druhy virů.

U herpesvirů (konkrétně u dvou zástupců podčeledi *Alphaherpesvirinae*: HSV-1 a PRV) byla prokázána tvorba F-aktinu v jádrech infikovaných buněk a jeho využití ke skládání virových kapsid a jejich následnému transportu z jádra. Jaderný aktin (není úplně jasné v jaké formě) hraje také klíčovou roli v maturaci replikačních kompartmentů a změnách morfologie jader při infekci HSV-1. Zatím bohužel nevíme, zda využití jaderného aktinu představuje obecný fenomén platný pro všechny herpetické viry, nebo o unikátní vlastnost alfaherpesvirů. Naopak interakce s jadernými laminy jsou, zdá se, typické pro všechny herpesviry. Jaderná lamina znamená zásadní překážku při úniku virového potomstva z jádra a herpesviry sdílí velmi podobné mechanismy vyvolání jejího rozpadu. Virem kódované proteiny kooperují s proteiny hostitelské buňky a indukují rozrušení jaderné laminy, které je způsobeno zejména fosforylací laminů virovými i hostitelskými kinázami.

Bakuloviry (zatím popsáno u několika nukleopolyhedrovirů) potřebují jaderný aktin ke správné morfogenezi virových kapsid a pravděpodobně také k jejich exportu z jádra. V tomto případě byly identifikovány virové proteiny zodpovědné za akumulaci aktinových monomerů v jádře i za jejich polymeraci s využitím hostitelského nukleátoru aktinových filament, komplexu Arp 2/3.

Jinou funkci jaderného cytoskeletu nacházíme v infekcích retroviry. Viry HIV-1 (lentivirus) a Mason-Pfizer monkey virus (betaretrovirus) transportují své nesestřižené RNA z jádra pomocí jaderného aktinu. Zde existuje určitý rozpor ohledně formy jaderného aktinu (polymerní, monomerní nebo jiná netradiční). Virus HIV-1 také indukují vznik defektů v jaderné lamině a jaderném obalu, které vedou k zastavení buněčného cyklu v G2 fázi.

Viry replikující se v jádře mohou interagovat s jaderným cytoskeletem a zapojit ho do různých dějů svého životního cyklu. V této práci popisují taková využití jaderného aktinu. Jaderný cytoskelet však může (podobně jako klasický cytoskelet) také působit jako fyzická bariéra šíření viru v buňce. V případě jaderného cytoskeletu takovou bariéru představuje jaderná lamina, kterou dokáží rozrušit herpetické viry. Předpokládám, že v budoucnosti budou prohloubeny poznatky, které shrnuji v této práci, a případně popsány interakce dalších skupin virů s jaderným cytoskeletem. Také je zapotřebí dořešit některé stávající otázky, týkající se zejména strukturních forem jaderného aktinu (za normálních okolností i v průběhu virových infekcí).

5 Seznam použité literatury

- Aebi, U., J. Cohn, L. Buhle & L. Gerace (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature*, 323, 560-4.
- Barboro, P., C. D'Arrigo, A. Diaspro, M. Mormino, I. Alberti, S. Parodi, E. Patrone & C. Balbi (2002) Unraveling the organization of the internal nuclear matrix: RNA-dependent anchoring of NuMA to a lamin scaffold. *Exp Cell Res*, 279, 202-18.
- Barboro, P., C. D'Arrigo, M. Mormino, R. Coradeghini, S. Parodi, E. Patrone & C. Balbi (2003) An intranuclear frame for chromatin compartmentalization and higher-order folding. *J Cell Biochem*, 88, 113-20.
- Bechtel, J. T., R. C. Winant & D. Ganem (2005) Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, 79, 4952-64.
- Bettinger, B. T., D. M. Gilbert & D. C. Amberg (2004) Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 410-5.
- Bjerke, S. L. & R. J. Roller (2006) Roles for herpes simplex virus type 1 UL34 and US3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress. *Virology*, 347, 261-76.
- Bridger, J. M., I. R. Kill, M. O'Farrell & C. J. Hutchison (1993) Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *J Cell Sci*, 104 (Pt 2), 297-306.
- Camozzi, D., S. Pignatelli, C. Valvo, G. Lattanzi, C. Capanni, P. Dal Monte & M. P. Landini (2008) Remodelling of the nuclear lamina during human cytomegalovirus infection: role of the viral proteins pUL50 and pUL53. *J Gen Virol*, 89, 731-40.
- Cano-Monreal, G. L., K. M. Wylie, F. Cao, J. E. Tavis & L. A. Morrison (2009) Herpes simplex virus 2 UL13 protein kinase disrupts nuclear lamins. *Virology*, 392, 137-47.
- Castano, E., V. V. Philimonenko, M. Kahle, J. Fukalová, A. Kalendová, S. Yildirim, R. Dzijak, H. Dingová-Krásna & P. Hozák (2010) Actin complexes in the cell nucleus: new stones in an old field. *Histochem Cell Biol*, 133, 607-26.
- Chang, Y. E. & B. Roizman (1993) The product of the UL31 gene of herpes simplex virus 1 is a nuclear phosphoprotein which partitions with the nuclear matrix. *J Virol*, 67, 6348-56.
- Charlton, C. A. & L. E. Volkman (1991) Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J Virol*, 65, 1219-27.
- (1993) Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology*, 197, 245-54.
- Chen, M. & X. Shen (2007) Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 326-30.
- Clark, T. G. & J. L. Rosenbaum (1979) An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. *Cell*, 18, 1101-8.
- Cullen, B. R. (2003) Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci*, 28, 419-24.
- de Bruyn Kops, A., S. L. Uprichard, M. Chen & D. M. Knipe (1998) Comparison of the intranuclear distributions of herpes simplex virus proteins involved in various viral functions. *Virology*, 252, 162-78.
- de Noronha, C. M., M. P. Sherman, H. W. Lin, M. V. Cavrois, R. D. Moir, R. D. Goldman & W. C. Greene (2001) Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science*, 294, 1105-8.
- del Rio, T., C. J. DeCoste & L. W. Enquist (2005) Actin is a component of the compensation mechanism in pseudorabies virus virions lacking the major tegument protein VP22. *J Virol*, 79, 8614-9.
- Ecob-Johnston, M. S. & W. O. Whetsell (1979) Host-cell response to herpes virus infection in central and peripheral nervous tissue in vitro. *J Gen Virol*, 44, 747-57.
- Farina, A., R. Feederle, S. Raffa, R. Gonnella, R. Santarelli, L. Frati, A. Angeloni, M. R. Torrisi, A. Faggioni & H. J. Delecluse (2005) BFRF1 of Epstein-Barr virus is essential for efficient primary viral envelopment and egress. *J Virol*, 79, 3703-12.
- Favoreel, H. W., L. W. Enquist & B. Feuerbach (2007) Actin and Rho GTPases in herpesvirus biology. *Trends Microbiol*, 15, 426-33.

- Feierbach, B., S. Piccinotti, M. Bisher, W. Denk & L. W. Enquist (2006) Alpha-herpesvirus infection induces the formation of nuclear actin filaments. *PLoS Pathog*, 2, e85.
- Fomproix, N. & P. Percipalle (2004) An actin-myosin complex on actively transcribing genes. *Exp Cell Res*, 294, 140-8.
- Forest, T., S. Barnard & J. D. Baines (2005) Active intranuclear movement of herpesvirus capsids. *Nat Cell Biol*, 7, 429-31.
- Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, N. Osterrieder & T. C. Mettenleiter (2002) 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*, 76, 364-78.
- Goldberg, M. W., I. Huttenlauch, C. J. Hutchison & R. Stick (2008) Filaments made from A- and B-type lamins differ in structure and organization. *J Cell Sci*, 121, 215-25.
- Goldman, A. E., R. D. Moir, M. Montag-Lowy, M. Stewart & R. D. Goldman (1992) Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *J Cell Biol*, 119, 725-35.
- Goley, E. D., T. Ohkawa, J. Mancuso, J. B. Woodruff, J. A. D'Alessio, W. Z. Cande, L. E. Volkman & M. D. Welch (2006) Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein. *Science*, 314, 464-7.
- Gonnella, R., A. Farina, R. Santarelli, S. Raffa, R. Feederle, R. Bei, M. Granato, A. Modesti, L. Frati, H. J. Delecluse, M. R. Torrisi, A. Angeloni & A. Faggioni (2005) Characterization and intracellular localization of the Epstein-Barr virus protein BFLF2: interactions with BFRF1 and with the nuclear lamina. *J Virol*, 79, 3713-27.
- Grünewald, K., P. Desai, D. C. Winkler, J. B. Heymann, D. M. Belnap, W. Baumeister & A. C. Steven (2003) Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science*, 302, 1396-8.
- Guarino, L. 2005. Baculoviruses. Encyclopedia of Life Sciences: John Wiley & Sons.
- Hamirally, S., J. P. Kamil, Y. M. Ndassa-Colday, A. J. Lin, W. J. Jahng, M. C. Baek, S. Noton, L. A. Silva, M. Simpson-Holley, D. M. Knipe, D. E. Golan, J. A. Marto & D. M. Coen (2009) Viral mimicry of Cdc2/cyclin-dependent kinase 1 mediates disruption of nuclear lamina during human cytomegalovirus nuclear egress. *PLoS Pathog*, 5, e1000275.
- Hess, R. T., P. A. Goldsmith & L. E. Volkman (1989) Effect of cytochalasin D on cell morphology and AcMNPV replication in a *Spodoptera frugiperda* cell line. *J Invertebr Pathol*, 53, 169-82.
- Hofmann, W., B. Reichart, A. Ewald, E. Müller, I. Schmitt, R. H. Stauber, F. Lottspeich, B. M. Jockusch, U. Scheer, J. Hauber & M. C. Dabauvalle (2001) Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol*, 152, 895-910.
- Hofmann, W. A., L. Stojiljkovic, B. Fuchsova, G. M. Vargas, E. Mavrommatis, V. Philimonenko, K. Kysela, J. A. Goodrich, J. L. Lessard, T. J. Hope, P. Hozak & P. de Lanerolle (2004) Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*, 6, 1094-101.
- Hofmann, W. A., G. M. Vargas, R. Ramchandran, L. Stojiljkovic, J. A. Goodrich & P. de Lanerolle (2006) Nuclear myosin I is necessary for the formation of the first phosphodiester bond during transcription initiation by RNA polymerase II. *J Cell Biochem*, 99, 1001-9.
- Hozák, P., A. M. Sasseville, Y. Raymond & P. R. Cook (1995) Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *J Cell Sci*, 108 (Pt 2), 635-44.
- Hu, P., S. Wu & N. Hernandez (2004) A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev*, 18, 3010-5.
- Kasman, L. M. & L. E. Volkman (2000) Filamentous actin is required for lepidopteran nucleopolyhedrovirus progeny production. *J Gen Virol*, 81, 1881-8.
- Kato, A., M. Yamamoto, T. Ohno, M. Tanaka, T. Sata, Y. Nishiyama & Y. Kawaguchi (2006) Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31. *J Virol*, 80, 1476-86.
- Kattenhorn, L. M., R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H. L. Ploegh & B. M. Kessler (2004) Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol*, 78, 11187-97.

- Kimura, T., I. Hashimoto, A. Yamamoto, M. Nishikawa & J. I. Fujisawa (2000) Rev-dependent association of the intron-containing HIV-1 gag mRNA with the nuclear actin bundles and the inhibition of its nucleocytoplasmic transport by latrunculin-B. *Genes Cells*, 5, 289-307.
- Kiseleva, E., S. P. Drummond, M. W. Goldberg, S. A. Rutherford, T. D. Allen & K. L. Wilson (2004) Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *J Cell Sci*, 117, 2481-90.
- Klupp, B. G., H. Granzow & T. C. Mettenleiter (2000) Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product. *J Virol*, 74, 10063-73.
- (2001) Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J Gen Virol*, 82, 2363-71.
- Knipe, D. M., D. Senechek, S. A. Rice & J. L. Smith (1987) Stages in the nuclear association of the herpes simplex virus transcriptional activator protein ICP4. *J Virol*, 61, 276-84.
- Kukalev, A., Y. Nord, C. Palmberg, T. Bergman & P. Percipalle (2005) Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 238-44.
- Kyselá, K., A. A. Philimonenko, V. V. Philimonenko, J. Janáček, M. Kahle & P. Hozák (2005) Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. *Histochem Cell Biol*, 124, 347-58.
- Lake, C. M. & L. M. Hutt-Fletcher (2004) The Epstein-Barr virus BFRF1 and BFLF2 proteins interact and coexpression alters their cellular localization. *Virology*, 320, 99-106.
- Lanier, L. M. & L. E. Volkman (1998) Actin binding and nucleation by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 243, 167-77.
- Leach, N., S. L. Bjerke, D. K. Christensen, J. M. Bouchard, F. Mou, R. Park, J. Baines, T. Haraguchi & R. J. Roller (2007) Emerin is hyperphosphorylated and redistributed in herpes simplex virus type 1-infected cells in a manner dependent on both UL34 and US3. *J Virol*, 81, 10792-803.
- Leach, N. R. & R. J. Roller (2010) Significance of host cell kinases in herpes simplex virus type 1 egress and lamin-associated protein disassembly from the nuclear lamina. *Virology*, 406, 127-37.
- Lee, C. P., Y. H. Huang, S. F. Lin, Y. Chang, Y. H. Chang, K. Takada & M. R. Chen (2008) Epstein-Barr virus BGLF4 kinase induces disassembly of the nuclear lamina to facilitate virion production. *J Virol*, 82, 11913-26.
- Leopardi, R., P. L. Ward, W. O. Ogle & B. Roizman (1997) Association of herpes simplex virus regulatory protein ICP22 with transcriptional complexes containing EAP, ICP4, RNA polymerase II, and viral DNA requires posttranslational modification by the U(L)13 protein kinase. *J Virol*, 71, 1133-9.
- Li, K., Y. Wang, H. Bai, Q. Wang, J. Song, Y. Zhou, C. Wu & X. Chen (2010) The putative pocket protein binding site of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus BV/ODV-C42 is required for virus-induced nuclear actin polymerization. *J Virol*, 84, 7857-68.
- Liang, L. & J. D. Baines (2005) Identification of an essential domain in the herpes simplex virus 1 UL34 protein that is necessary and sufficient to interact with UL31 protein. *J Virol*, 79, 3797-806.
- Machesky, L. M., R. H. Insall & L. E. Volkman (2001) WASP homology sequences in baculoviruses. *Trends Cell Biol*, 11, 286-7.
- Marek, M., O. W. Merten, L. Galibert, J. M. Vlak & M. M. van Oers (2011a) Baculovirus VP80 protein and the F-actin cytoskeleton interact connecting the viral replication factory with the nuclear periphery. *J Virol*.
- Marek, M., M. M. van Oers, F. F. Devaraj, J. M. Vlak & O. W. Merten (2011b) Engineering of baculovirus vectors for the manufacture of virion-free biopharmaceuticals. *Biotechnol Bioeng*, 108, 1056-67.
- Marschall, M., A. Marzi, P. aus dem Siepen, R. Jochmann, M. Kalmer, S. Auerochs, P. Lischka, M. Leis & T. Stamminger (2005) Cellular p32 recruits cytomegalovirus kinase pUL97 to redistribute the nuclear lamina. *J Biol Chem*, 280, 33357-67.
- McDonald, D., G. Carrero, C. Andrin, G. de Vries & M. J. Hendzel (2006) Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J Cell Biol*, 172, 541-52.

- Milbradt, J., S. Auerochs & M. Marschall (2007) Cytomegaloviral proteins pUL50 and pUL53 are associated with the nuclear lamina and interact with cellular protein kinase C. *J Gen Virol*, 88, 2642-50.
- Milbradt, J., S. Auerochs, H. Sticht & M. Marschall (2009) Cytomegaloviral proteins that associate with the nuclear lamina: components of a postulated nuclear egress complex. *J Gen Virol*, 90, 579-90.
- Milbradt, J., R. Weibel, S. Auerochs, H. Sticht & M. Marschall (2010) Novel mode of phosphorylation-triggered reorganization of the nuclear lamina during nuclear egress of human cytomegalovirus. *J Biol Chem*, 285, 13979-89.
- Miralles, F. & N. Visa (2006) Actin in transcription and transcription regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 261-6.
- Moir, R. D., M. Montag-Lowy & R. D. Goldman (1994) Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol*, 125, 1201-12.
- Monier, K., J. C. Armas, S. Etteldorf, P. Ghazal & K. F. Sullivan (2000) Annexation of the interchromosomal space during viral infection. *Nat Cell Biol*, 2, 661-5.
- Morris, J. B., H. Hofemeister & P. O'Hare (2007) Herpes simplex virus infection induces phosphorylation and delocalization of emerin, a key inner nuclear membrane protein. *J Virol*, 81, 4429-37.
- Mou, F., T. Forest & J. D. Baines (2007) US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J Virol*, 81, 6459-70.
- Mou, F., E. Wills & J. D. Baines (2009) Phosphorylation of the U(L)31 protein of herpes simplex virus 1 by the U(S)3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *J Virol*, 83, 5181-91.
- Mou, F., E. G. Wills, R. Park & J. D. Baines (2008) 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*, 82, 8094-104.
- Muranyi, W., J. Haas, M. Wagner, G. Krohne & U. H. Koszinowski (2002) Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science*, 297, 854-7.
- Nagel, C. H., K. Döhner, M. Fathollahy, T. Strive, E. M. Borst, M. Messerle & B. Sodeik (2008) Nuclear egress and envelopment of herpes simplex virus capsids analyzed with dual-color fluorescence HSV1(17+). *J Virol*, 82, 3109-24.
- Nalepa, G. & J. W. Harper (2004) Visualization of a highly organized intranuclear network of filaments in living mammalian cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 59, 94-108.
- Neri, L. M., Y. Raymond, A. Giordano, S. Capitani & A. M. Martelli (1999) Lamin A is part of the internal nucleoskeleton of human erythroleukemia cells. *J Cell Physiol*, 178, 284-95.
- Nowak, G., L. Pestic-Dragovich, P. Hozák, A. Philimonenko, C. Simerly, G. Schatten & P. de Lanerolle (1997) Evidence for the presence of myosin I in the nucleus. *J Biol Chem*, 272, 17176-81.
- Obrdlik, A., E. Louvet, A. Kukalev, D. Naschekin, E. Kiseleva, B. Fahrenkrog & P. Percipalle (2010) Nuclear myosin 1 is in complex with mature rRNA transcripts and associates with the nuclear pore basket. *FASEB J*, 24, 146-57.
- Ohkawa, T., A. R. Rowe & L. E. Volkman (2002) Identification of six *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus early genes that mediate nuclear localization of G-actin. *J Virol*, 76, 12281-9.
- Ohkawa, T. & L. E. Volkman (1999) Nuclear F-actin is required for AcMNPV nucleocapsid morphogenesis. *Virology*, 264, 1-4.
- Olave, I. A., S. L. Reck-Peterson & G. R. Crabtree (2002) Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem*, 71, 755-81.
- Panté, N. & M. Kann (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell*, 13, 425-34.
- Park, R. & J. D. Baines (2006) Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *J Virol*, 80, 494-504.
- Pederson, T. & U. Aebi (2002) Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol*, 140, 3-9.

- Percipalle, P., N. Fomproix, E. Cavellán, R. Voit, G. Reimer, T. Krüger, J. Thyberg, U. Scheer, I. Grummt & A. K. Farrants (2006) The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO Rep*, 7, 525-30.
- Percipalle, P., A. Jonsson, D. Nashchekin, C. Karlsson, T. Bergman, A. Guialis & B. Daneholt (2002) Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucleic Acids Res*, 30, 1725-34.
- Percipalle, P., J. Zhao, B. Pope, A. Weeds, U. Lindberg & B. Daneholt (2001) Actin bound to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hrp36 is associated with Balbiani ring mRNA from the gene to polysomes. *J Cell Biol*, 153, 229-36.
- Pestic-Dragovich, L., L. Stojiljkovic, A. A. Philimonenko, G. Nowak, Y. Ke, R. E. Settlage, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, P. Hozak & P. de Lanerolle (2000) A myosin I isoform in the nucleus. *Science*, 290, 337-41.
- Phelan, A., J. Dunlop, A. H. Patel, N. D. Stow & J. B. Clements (1997) Nuclear sites of herpes simplex virus type 1 DNA replication and transcription colocalize at early times postinfection and are largely distinct from RNA processing factors. *J Virol*, 71, 1124-32.
- Philimonenko, V. V., J. Zhao, S. Iben, H. Dingová, K. Kyselá, M. Kahle, H. Zentgraf, W. A. Hofmann, P. de Lanerolle, P. Hozák & I. Grummt (2004) Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol*, 6, 1165-72.
- Prichard, M. N. (2009) Function of human cytomegalovirus UL97 kinase in viral infection and its inhibition by maribavir. *Rev Med Virol*, 19, 215-29.
- Prokocimer, M., M. Davidovich, M. Nissim-Rafinia, N. Wiesel-Motiuk, D. Z. Bar, R. Barkan, E. Meshorer & Y. Gruenbaum (2009) Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities. *J Cell Mol Med*, 13, 1059-85.
- Randall, R. E. & N. Dinwoodie (1986) Intranuclear localization of herpes simplex virus immediate-early and delayed-early proteins: evidence that ICP 4 is associated with progeny virus DNA. *J Gen Virol*, 67 (Pt 10), 2163-77.
- Reynolds, A. E., L. Liang & J. D. Baines (2004) Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J Virol*, 78, 5564-75.
- Reynolds, A. E., B. J. Ryckman, J. D. Baines, Y. Zhou, L. Liang & R. J. Roller (2001) U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J Virol*, 75, 8803-17.
- Reynolds, A. E., E. G. Wills, R. J. Roller, B. J. Ryckman & J. D. Baines (2002) 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*, 76, 8939-52.
- Roller, R. J., Y. Zhou, R. Schnetzer, J. Ferguson & D. DeSalvo (2000) Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *J Virol*, 74, 117-29.
- Ryckman, B. J. & R. J. Roller (2004) Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *J Virol*, 78, 399-412.
- Scheer, U., H. Hinssen, W. W. Franke & B. M. Jockusch (1984) Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell*, 39, 111-22.
- Schoenenberger, C. A., S. Buchmeier, M. Boerries, R. Sütterlin, U. Aebi & B. M. Jockusch (2005) Conformation-specific antibodies reveal distinct actin structures in the nucleus and the cytoplasm. *J Struct Biol*, 152, 157-68.
- Scott, E. S. & P. O'Hare (2001) Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol*, 75, 8818-30.
- Shiba, C., T. Daikoku, F. Goshima, H. Takakuwa, Y. Yamauchi, O. Koiwai & Y. Nishiyama (2000) The UL34 gene product of herpes simplex virus type 2 is a tail-anchored type II membrane protein that is significant for virus envelopment. *J Gen Virol*, 81, 2397-405.
- Simpson-Holley, M., J. Baines, R. Roller & D. M. Knipe (2004) Herpes simplex virus 1 U(L)31 and U(L)34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery. *J Virol*, 78, 5591-600.
- Simpson-Holley, M., R. C. Colgrove, G. Nalepa, J. W. Harper & D. M. Knipe (2005) Identification and functional evaluation of cellular and viral factors involved in the alteration of nuclear architecture during herpes simplex virus 1 infection. *J Virol*, 79, 12840-51.

- Sjölander, M., P. Björk, E. Söderberg, N. Sabri, A. K. Farrants & N. Visa (2005) The growing pre-mRNA recruits actin and chromatin-modifying factors to transcriptionally active genes. *Genes Dev*, 19, 1871-84.
- Skepper, J. N., A. Whiteley, H. Browne & A. Minson (2001) Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol*, 75, 5697-702.
- Taylor, T. J., E. E. McNamee, C. Day & D. M. Knipe (2003) Herpes simplex virus replication compartments can form by coalescence of smaller compartments. *Virology*, 309, 232-47.
- van Hal, S. & D. Dwyer. 2009. Herpes Simplex: Viruses and Infections. Encyclopedia of Life Sciences (ELS): JohnWiley&Sons, Ltd: Chichester.
- Varnum, S. M., D. N. Strelow, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith & J. A. Nelson (2004) Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol*, 78, 10960-6.
- Volkman, L. E., P. A. Goldsmith & R. T. Hess (1987) Evidence for microfilament involvement in budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus production. *Virology*, 156, 32-9.
- Volkman, L. E., S. N. Talhouk, D. I. Oppenheimer & C. A. Charlton. 1992. Nuclear F-actin: a functional component of baculovirus-infected lepidopteran cells? , 15-22. *Journal of Cell Science*.
- Wang, Q., C. Liang, J. Song & X. Chen (2007) HA2 from the Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus: a WASP-related protein that activates Arp2/3-induced actin filament formation. *Virus Res*, 127, 81-7.
- Wang, Y., Q. Wang, C. Liang, J. Song, N. Li, H. Shi & X. Chen (2008) Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus nucleocapsid protein BV/ODV-C42 mediates the nuclear entry of P78/83. *J Virol*, 82, 4554-61.
- Ward, P. L., W. O. Ogle & B. Roizman (1996) Assemblons: nuclear structures defined by aggregation of immature capsids and some tegument proteins of herpes simplex virus 1. *J Virol*, 70, 4623-31.
- Whitley, R. J. 2006. Herpesviruses (Human). Encyclopedia of Life Sciences: JohnWiley&Sons, Ltd: Chichester.
- Wong, M. L. & C. H. Chen (1998) Evidence for the internal location of actin in the pseudorabies virion. *Virus Res*, 56, 191-7.
- Worman, H. J. & G. Bonne (2007) "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res*, 313, 2121-33.
- Yamauchi, Y., C. Shiba, F. Goshima, A. Nawa, T. Murata & Y. Nishiyama (2001) Herpes simplex virus type 2 UL34 protein requires UL31 protein for its relocation to the internal nuclear membrane in transfected cells. *J Gen Virol*, 82, 1423-8.
- Ye, J., J. Zhao, U. Hoffmann-Rohrer & I. Grummt (2008) Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes Dev*, 22, 322-30.
- Zhao, K., W. Wang, O. J. Rando, Y. Xue, K. Swiderek, A. Kuo & G. R. Crabtree (1998) Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell*, 95, 625-36.
- Zheng, B., M. Han, M. Bernier & J. K. Wen (2009) Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J*, 276, 2669-85.
- Zhong, Z., K. L. Wilson & K. N. Dahl (2010) Beyond lamins other structural components of the nucleoskeleton. *Methods Cell Biol*, 98, 97-119.
- Zhu, F. X., J. M. Chong, L. Wu & Y. Yuan (2005) Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, 79, 800-11.