

Streszczenie

Wirusy to wewnątrzkomórkowe pasożyty, które mogą replikować się jedynie wewnątrz komórek i wymagają maszynerii komórkowej do replikacji własnych białek. Zasadniczym etapem każdej infekcji wirusowej jest przechodzenie nowo zsyntetyzowanych cząstek wirusowych do kolejnych komórek permisywnych. Proces ten może zajść poprzez uwolnienie dojrzałej cząsteczki wirusowej do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, skąd wirus może rozprzestrzeniać się do otaczających komórek. W tym czasie cząsteczki wirusowe narażone są na atak ze strony układu immunologicznego gospodarza, polegający na wydzielaniu interferonu i innych pro-zapalnych cytokin przez cytotoksyczne limfocyty T, aktywację komórek NK oraz produkcję przeciwciał neutralizujących.

Wirusy rozwinęły różnorodne strategie pozwalające na uniknięcie wykrycia i eliminacji przez układ odpornościowy. Jedną z tych strategii jest omijanie środowiska zewnątrzkomórkowego. Niektóre wirusy podczas swojego cyklu życiowego omijają etap uwalniania nowo zsyntetyzowanych wirionów z komórki i przekazują je bezpośrednio do sąsiadującej komórki permisywnej za pomocą połączeń komórkowych. Proces ten nazywany jest bezpośrednią transmisją z komórki do komórki, ang. „cell-to-cell spread”. Droga bezpośredniej transmisji wirusa z komórki do komórki wykorzystywane jest przez wiele wirusów ludzkich i zwierzęcych. W przypadku alfaherpeswirusów, będących przedmiotem badań przedstawionych w tej pracy doktorskiej, warunkiem skutecznej infekcji wirusowej jest przebycie dalekiej drogi od miejsca pierwotnej infekcji do miejsca latencji. Zakażenie zaczyna się w błonach śluzowych, skąd wirus musi dotrzeć do obwodowego układu nerwowego, gdzie przechodzi w utajony etap cyklu rozwojowego, stan latencji, w zwojach nerwowych. Co więcej, podczas reaktywacji ze stanu latentnego, nowo powstałe cząstki wirusowe mogą być łatwo rozpoznane przez układ immunologiczny, którego odpowiedź na obecność tego wirusa została wytworzona w czasie pierwotnej infekcji. Z tych względów droga wewnątrzkomórkowa jest bardzo ważnym dla alfaherpeswirusów sposobem rozprzestrzeniania się w zakażonym organizmie.

Celem mojej pracy było lepsze poznanie mechanizmu bezpośredniej transmisji alfaherpeswirusów między komórkami, a w szczególności dogłębne zbadanie zdolności tych wirusów do wykorzystywania długich połączeń międzykomórkowych, określaných

po angielsku jako „tunneling nanotubes” (TNT) w tym procesie. Połączenia tego typu nie mają jeszcze ustalonej nazwy w języku polskim i na potrzeby tej pracy zostały określone jako „międzykomórkowe nanorurki” oraz zamiennie nazywane jako TNT. Pierwszym etapem pracy było ustalenie metod utrwalania TNT, co pozwoliło na późniejszą, odtwarzalną analizę tych połączeń. Charakterystyka nanorurek została przeprowadzona na komórkach niezainfekowanych. Ze względu na skład, połączenia te zostały sklasyfikowane jako zawierające F-aktynę i tubulinę lub jedynie F-aktynę. Ze względu na długość, wyróżniłam dwa typy: krótkie ($\leq 20 \mu\text{m}$) i długie ($> 20 \mu\text{m}$).

Kolejnym etapem pracy było opisanie roli nanorurek podczas infekcji wirusowej. Do tych eksperymentów użyty został wirus BoHV-1 (bydlęcy herpeswirus typu 1), który stosowany jest jako model do badań nad herpeswirusami ze względu na jego bliskie pokrewieństwo biologiczne do innych alfaherpeswirusów, takich jak ludzkie wirusy HSV-1 i VZV. Wykazałam, że białka wirusowe pochodzące z różnych części cząsteczki wirusowej BoHV-1 są wykrywane w nanorurkach. Dodatkowo pokazałam, że infekcja wirusowa stymuluje powstawanie większej liczby TNT pomiędzy komórkami, przy czym rośnie liczba nanorurek o większej długości. Następnie, przy użyciu fluorescencyjnych mutantów BoHV-1, pokazałam, że wirus jest zdolny do infekowania kolejnych komórek permissywnych poprzez bezpośrednią transmisję przez nanorurkę nawet w obecności przeciwciał neutralizujących, uniemożliwiających zakażenie od zewnątrz. Taka transmisja została również wykryta pomiędzy komórkami różnego pochodzenia

Dalszym krokiem było zbadanie roli białka Us3 w tym procesie. Białko Us3 jest kinazą serynowo-treoninową, która pełni wiele funkcji podczas infekcji herpeswirusowej. Wykazano, że kinaza Us3 posiada zdolność do rearanżacji cytoszkieletu komórkowego, przy czym funkcja ta jest zależna od jego aktywności kinazowej. Dla ułatwienia badań nad Us3 przygotowałam dwa fluorescencyjne mutanty BoHV-1: wariant zawierający białko Us3 typu dzikiego i mutant Us3-K282A pozbawiony aktywności kinazowej. Obydwa konstrukty zostały scharakteryzowane i użyte do analizy wpływu tego białka na tworzenie TNT. Wykazałam, że brak aktywności kinazowej białka Us3 wpływa na ilość i długość nanorurek – tworzy się ich mniej i są krótsze niż podczas obecności białka typu dzikiego. Efekt ten jest bardziej widoczny na późniejszym etapie infekcji. Dodatkowo przygotowałam konstrukt zawierający skróconą formę Us3 zawierającą jedynie rejon domeny kinazowej, który wykazywał brak zdolności do

rearanżacji cytoszkieletu komórkowego, lecz zachował częściowo zdolność do fosforylowania swoich substratów.

Podczas moich badań przeprowadziłam również analizę roli białka Us3 w komórkach nerwowych. W tym celu neurony szczurze zostały transfekowane plazmidami zawierającymi sekwencje Us3-WT i Us3-K282A. W odróżnieniu do innych badanych komórek, ekspresja Us3 typu dzikiego w neuronach powodowała zmiany prowadzące do śmierci komórek. Efekt ten nie został zaobserwowany dla komórek ekspresyjujących Us3-K282A.

Podsumowując, uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na istotną rolę nanorurek (TNT) w procesie bezpośredniej transmisji międzykomórkowej alfa herpeswirusów. Jest to pierwsza taka obserwacja uzyskana dla DNA wirusów, gdyż dotychczas opublikowane prace na temat roli TNT w infekcji wirusowej dotyczyły RNA wirusów (HIV, wirus grypy). Wyniki pracy wnoszą też nowe informacje na temat ważnej, choć wciąż nie do końca wyjaśnionej roli kinazy Us3 w tym procesie.