

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

Streszczenie

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

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

Pracę badawczą podzielono na dwa etapy - analizę przyżyciową rozprzestrzeniania się fluorescencyjnych rekombinantów wirusowych na drodze CTC w hodowlach

komórkowych oraz na badanie oddziaływania kompleksu gE/gI z białkami komórkowymi w tym procesie.

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

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

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

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