

**Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii**

Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

***mgr Kinga Maria Grabowska***

Interakcje glikoproteiny B wybranych  
alfaherpeswirusów z białkami szlaku  
endosomalno-egzosomalnego  
oraz cząsteczkami MHC klasy II

Interactions of selected alphaherpesviral glycoprotein B  
homologs with the endosomal-exosomal pathway  
proteins and MHC class II molecules

Praca przedstawiona

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

Promotor: **prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk**

Promotor pomocniczy: **dr Andrea Lipińska**

Zakład Biologii Molekularnej Wirusów

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

GDAŃSK 2021

D O M

*Składam serdeczne podziękowania –*

***prof. dr hab. Krystynie Bieńkowskiej-Szewczyk i dr Andrei Lipińskiej***  
*za zaangażowanie w opiekę naukową, przekazaną wiedzę i cenne rady  
oraz pomoc w redagowaniu niniejszej pracy*

***prof. Pawłowi Ciborowskiemu***  
*za możliwość naukowej współpracy podczas mojego stażu  
oraz twórcze dyskusje nad -Tym, co zwiemy Nauką-*

***Koleżankom i Kolegom***  
***z Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów***  
***i Zakładu Szczepionek Rekombinowanych***  
*za wspianą atmosferę pracy i pomoc w codziennym życiu laboratoryjnym*

***Rodzinie i Przyjaciołom***  
*za nieustające wsparcie, entuzjizm i szczerze zainteresowanie  
na całej drodze mojej edukacji*

# SPIS TREŚCI

<b>1</b>	<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>WSTĘP .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.</b>	<b>Szlak endosomalno – egzosomalny .....</b>	<b>14</b>
3.1.1	Endosomalny transport białek .....	14
3.1.1.1	Tworzenie ciał wielopęcherzykowych (MVBs) .....	16
3.1.1.2	Koordinacja szlaku endosomalnego z udziałem białek Rab .....	16
3.1.2	Transport cząsteczek MHC klasy II .....	17
3.1.3	Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako system komunikacji międzykomórkowej.....	18
3.1.4	Krzyżowanie się szlaku endosomalno – egzosomalnego z cyklem replikacyjnym wirusów... ..	24
<b>3.2</b>	<b>Glikoproteina B wybranych przedstawicieli alfaherpeswirusów, jej funkcje i oddziaływanie z białkami komórki gospodarza .....</b>	<b>26</b>
3.2.1	Charakterystyka podrodziny <i>Alphaherpesvirinae</i> .....	26
3.2.1.1	Pozycja systematyczna wybranych alfaherpeswirusów, morfologia wirionu i organizacja genomu.....	27
3.2.1.2	Cykl replikacyjny alfaherpeswirusów .....	30
3.2.1.3	Odpowiedź immunologiczna i wirusowe mechanizmy ingerencji w infekcji alfaherpeswirusowej .....	32
3.2.1.4	Wykorzystanie szlaków endocytozy przez wirusowe glikoproteiny podczas cyklu replikacyjnego .....	35
3.2.2	Glikoproteina B alfaherpeswirusów .....	37
3.2.2.1	Struktura glikoproteiny B alfaherpeswirusów i funkcje na różnych etapach infekcji .....	37
3.2.2.2	Właściwości immunomodulacyjne glikoproteiny B alfaherpeswirusów poprzez interakcje z cząsteczkami MHC klasy II.....	39
<b>4</b>	<b>CEL PRACY .....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAŁY .....</b>	<b>42</b>
5.1	Szczepy bakteryjne .....	42
5.2	Szczepy wirusowe.....	42
5.3	Wektory plazmidowe.....	42
5.4	Sekwencje nukleotydowe genów wirusowych .....	45
5.5	Linie komórkowe .....	46
5.6	Media hodowlane komórek bakteryjnych i ssaczyh .....	47
5.7	Przeciwciała i znaczniki fluorescencyjne .....	48

5.8	Startery.....	52
5.9	Wzorce masowe .....	52
5.10	Enzymy.....	52
5.11	Bufory i inne odczynniki.....	54
5.12	Aparatura i inne materiały .....	59
5.13	Bazy danych i oprogramowanie komputerowe .....	61
6	<b>METODY .....</b>	<b>62</b>
6.1	<b>Metody pracy z DNA .....</b>	<b>62</b>
6.1.1	Izolacja DNA wirusowego .....	62
6.1.2	Przygotowanie komórek kompetentnych .....	62
6.1.3	Transformacja komórek bakteryjnych DNA plazmidowym .....	63
6.1.4	Oczyszczanie DNA plazmidowego .....	63
6.1.5	Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA .....	63
6.1.6	Elektroforeza DNA w żelu agarozowym .....	64
6.1.7	Izolacja DNA z żelu agarazowego .....	65
6.1.8	Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych.....	65
6.1.9	Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi.....	65
6.1.10	Defosforylacja 5' wystających końców DNA przy użyciu antarktycznej fosfatazy .....	66
6.1.11	Ligacja fragmentów DNA za pomocą ligazy DNA faga T4.....	66
6.2	<b>Metody pracy z komórkami ssaczymi .....</b>	<b>67</b>
6.2.1	Hodowle linii komórek ssaczyc.....	67
6.2.2	Namnażanie i miareczkowanie wirusa (ang. <i>plaque assay</i> ) .....	67
6.2.3	Transfekcja komórek pakujących GP2-293 kompleksami DNA z fosforanem wapnia ..	68
6.2.4	Transdukcja retrowirusowa.....	68
6.2.5	Sortowanie komórek ssaczyc .....	69
6.2.6	Cytometria przepływowa .....	69
6.2.7	Przygotowanie lizatów komórkowych.....	70
6.2.8	Barwienie immunofluorescencyjne komórek i mikroskopia konfokalna .....	70
6.3	<b>Metody pracy z białkami .....</b>	<b>71</b>
6.3.1	Immunoprecypitacja.....	71
6.3.2	Biochemiczna analiza N-glikozylacji białek.....	71
6.3.3	Elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach denaturujących .....	72
6.3.4	Western blotting .....	72
6.3.5	Test immunoenzymatyczny ELISA (ang. ELISA - <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ).....	73
6.4	<b>Metody pracy z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi .....</b>	<b>74</b>

6.4.1	Izolacja i oczyszczanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.....	74
6.4.1.1	Ultrawierowanie.....	74
6.4.1.2	Chromatografia wykluczania (ang. SEC – <i>size exclusion chromatography</i> ).....	74
6.4.1.3	Izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowli komórek zainfekowanych wirusem z wykorzystaniem ultrawierowania w gradiencie jodksanolu (OptiPrep™) .....	75
6.4.2	Mikroskopia elektronowa.....	75
6.4.3	Test internalizacji izolowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki ssące (ang. <i>extracellular vesicles uptake</i> ) .....	76
<b>7</b>	<b>WYNIKI.....</b>	<b>77</b>
<b>7.1</b>	<b>Badanie lokalizacji glikoproteiny B wybranych przedstawicieli alfaherpeswirusów na szlaku endosomalno-egzosomalnym .....</b>	<b>77</b>
7.1.1	Konstrukcja linii stabilnych z konstytutywną ekspresją genu gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV przy pomocy wektorów retrowirusowych .....	77
7.1.2	Obserwacja lokalizacji gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV na szlaku endosomalno-lizosomalnym.....	81
7.1.3	Obserwacja lokalizacji komórkowej gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV z jednoczesną wizualizacją cząsteczek MHC II oraz markera egzosomalnego CD63 .....	87
<b>7.2</b>	<b>Konserwacja ewolucyjna mechanizmu inkorporacji homologów gB wybranych przedstawicieli alfaherpeswirusów do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i oddziaływania gB z cząsteczkami MHC II .....</b>	<b>89</b>
7.2.1	Charakterystyka fizyko-biochemiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych izolowanych z hodowli linii komórkowych z gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV.....	89
7.2.2	Badanie inkorporacji gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych .....	93
7.2.3	Analiza wzoru glikozylacji glikoproteiny B wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV w otrzymanych liniach stabilnych MJS i preparatach pęcherzyków zewnątrzkomórkowych .....	95
7.2.4	Badanie interakcji pomiędzy gB wirusów HSV-1, BoHV-1 lub PRV i cząsteczkami MHC II oraz jej wpływu na poziom cząsteczek MHC II na powierzchni komórki .....	97
7.2.5	Analiza oddziaływania MHC II-glikoproteina B oraz porównanie podobieństwa sekwencji aminokwasowej glikoproteiny B wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV oraz niezmiennego łańcucha związanego z antygenami głównego układu zgodności tkankowej klasy II .....	99
<b>7.3</b>	<b>Charakterystyka fizyko-biochemiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez komórki podczas infekcji HSV-1, BoHV-1 i PRV .....</b>	<b>103</b>
<b>7.4</b>	<b>Znaczenie biologiczne inkorporacji homologów gB wybranych przedstawicieli alfaherpeswirusów do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych .....</b>	<b>112</b>
7.4.1	Badanie zdolności wiązania przeciwciał surowicy anti-BoHV-1 przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe-gB BoHV-1 pozytywne.....	112
7.4.2	Test wychwytywania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych-gB-HSV-1 pozytywnych przez komórki ssące (ang. <i>extracellular vesicles uptake</i> ) .....	114

7.4.2.1 Ocena możliwości zastosowania znacznika zielonej fluorescencji dla ogólnego barwienia błony komórkowej – PKH67 – do znakowania preparatów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych .....	114
7.4.2.2 Obserwacja wychwytywania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych-gB HSV-1 pozytywnych przez komórki ssacze Huh7 z uwzględnieniem badania kierowania znakowanych struktur biologicznych na ścieżkę lizosomalną.....	115
<b>8 DYSKUSJA .....</b>	<b>120</b>
<b>9 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>129</b>
<b>10 MATERIAŁY DODATKOWE – FILMY Z MIKROSKOPOWEGO ZAPISU POKŁATKOWEGO TESTU WYCHWYTYWANIA PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH -gB HSV-1 POZYTYWNYCH PRZEZ KOMÓRKI SSACZE Huh7.....</b>	<b>136</b>

# 1 WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- Alix** (ang. *apoptosis-linked gene 2-interacting protein X*) – białko cytoplazmatyczne, marker egzosomalny
- BHV-1, BoHV-1** (ang. *bovine herpesvirus 1*) – bydłęcy herpeswirus 1
- CD63** (ang. *cluster of differentiation 63*) – białko z rodziny tetraspanin, występujące w endosomach, marker egzosomalny
- CD9** (ang. *cluster of differentiation 9*) – białko z rodziny tetraspanin, występujące w endosomach, marker egzosomalny
- CNX** (ang. *calnexin*) – kalneksyna
- DR $\alpha$**  – podjednostka alfa cząsteczki ludzkiego głównego układu zgodności tkankowej klasy II
- DR $\beta$**  – podjednostka beta cząsteczki ludzkiego głównego układu zgodności tkankowej klasy II
- EEA1** (ang. *early endosome antigen 1*) – białko markerowe wczesnych endosomów
- ELISA** (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny
- EndoH** (ang. *endoglycosidase H*) – endoglikozydaza H
- ER** (ang. *endoplasmic reticulum*) – retikulum endoplazmatyczne, siateczka śródplazmatyczna
- ESCRT** (ang. *endosomal sorting complexes required for transport*) – kompleksy białkowe wymagane do sortowania i transportu endosomalnego, składają się z kompleksów białek cytozolowych, znanych jako ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III i Vps4
- EVs** (ang. *extracellular vesicles*) – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe
- FBS** (ang. *fetal bovine serum*) – bydłęca surowica płodowa
- Flot-2** (ang. *flotillin-2*) – białko izolowane z domen tratw kalweoli/lipidów, wiążących receptory czynnika wzrostu połączone ze szlakami transdukcji sygnału, marker egzosomalny
- hpi** (ang. *hours post infection*) - godziny po infekcji
- HSV-1** (ang. *herpes simplex virus 1*) - wirus opryszczki pospolitej 1
- IF** (ang. *immunofluorescence*) – immunofluorescencja
- Ii** (ang. *invariant chain*)/ **CD74** (ang. *cluster of differentiation 74*) – łańcuch gamma antygeny układu zgodności tkankowej klasy II, znany również jako niezmienny łańcuch związany z antygenami głównego układu zgodności tkankowej klasy II lub białko CD74
- ILVs** (ang. *intraluminal endosomal vesicles*) – małe pęcherzyki błonowe znajdujące się wewnątrz ciał wielopęcherzykowych (MVBs)
- IP** (ang. *immunoprecipitation*) – immunoprecypitacja
- IRES** (ang. *internal ribosome entry site*) – wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu
- kDa** (ang. *kilodaltons*) – jednostka masy cząsteczek (w tysiącach daltonów)
- kpz** – liczba tysięcy par zasad
- LAMP1** (ang. *lysosomal-associated membrane protein 1*) – białko błonowe typu I związane z lizosomami
- LTR** (ang. *long terminal repeats*) – długie terminalne powtórzenia identycznych sekwencji DNA o długości kilkuset par zasad, które występują w genomach eukariotycznych na każdym końcu serii



genów lub 7 pseudogenów, tworzących retrotranspozon, endogeny retrovirus, prowirus  
retrowirusowy

**MCS** (ang. *multiple cloning site*) – miejsce wielokrotnego klonowania

**MVBs** (ang. *multivesicular bodies*) – ciała wielopęcherzykowe, wyspecjalizowana podgrupa endosomów, zawierających w swoim wnętrzu pęcherzyki błonowe (ILVs)

**MHC II** (ang. *major histocompatibility complex class II*) - cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy II

**min** minuty

**MOI** (ang. *multiplicity of infection*) – wielokrotność zakażenia, liczba cząstek wirusa przypadająca na jedną komórkę

**NCBI** (ang. *National Center for Biotechnology Information*) – baza danych literaturowych

**NGFR** (ang. *nerve growth factor receptor*) – receptor nerwowego czynnika wzrostu

**ORF** (ang. *open reading frame*) – otwarta ramka odczytu

**PFU** (ang. *plaque forming unit*) – jednostka tworząca łysinkę, określa liczbę cząstek wirusowych tworzących łysinkę w hodowli komórek

**PCR** (ang. *polymerase chain reaction*) – łańcuchowa reakcja polimerazy

**PMA** (ang. *phorbol 12-myristate 13-acetate*) – 13-octan 12-mirystynianu forbolu

**PHA** (ang. *phytohemagglutinin*) – fitohemaglutynina

**PNGaza F** (ang. *peptide:N-glycosidase F*) – peptydylo-N-glikozydaza F

**PRV** (ang. *pseudorabies virus, suid herpesvirus 1*) – wirus pseudowścieklizny, świński herpeswirus 1

**SDS-PAGE electrophoresis** (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) – elektroforeza poliakryloamidowa w warunkach denaturujących

**SEC** (ang. *size-exclusion chromatography*) – chromatografia wykluczania

**PURO** – puromycyna

**Rab11** (ang. *Ras-related protein 11*) – białko z rodziny GTPaz Rab, marker frakcji RE (ang. *recycling endosomes*) endosomów, organelli szlaku endocytarnego, w którym błony plazmatyczne ulegają internalizacji oraz kierowaniu z powrotem na powierzchnię komórki

**Rab7** (ang. *Ras-related protein 7*) – białko z rodziny GTPaz Rab, marker frakcji późnych endosomów (ang. *late endosomes*)/ lizosomów

**Tom40** (ang. *translocase of outer mitochondrial membrane 40*) – translokaza zewnętrznej błony mitochondrialnej 40

**TSG101** (ang. *tumor susceptibility gene 101*) – białko pełniące funkcje na szlaku ESCRT, komponent ESCRT-I

**pz** – liczba par zasad

**rpm** (ang. *revolution per minute*) – liczba obrotów na minutę

**TGN** (ang. *trans-Golgi network*) – część trans aparatu Golgiego

## 2 STRESZCZENIE

**Herpeswirusy** to jedne z najbardziej rozpowszechnionych patogenów, powodujące infekcje zarówno u ludzi, jak i praktycznie wszystkich zwierząt hodowlanych oraz dziko żyjących. Cząsteczki wszystkich herpeswirusów mają unikalną charakterystyczną architekturę. Ich genom, w postaci dwuniciowego DNA, jest zamknięty w ikozaedralnym kapsydie, otoczonym płaszczem białkowym zwanym tegumentem i dwuwarstwową osłonką lipidowej wzbogaconą w glikoproteiny wirusowe. Podział herpeswirusów na podrodziny alfa-, beta- i gammaherpeswirusy służy identyfikacji pokrewieństwa ewolucyjnego, a także podsumowaniu właściwości poszczególnych przedstawicieli tej rodziny wirusów. Pomimo szerokiego stanu wiedzy i zaawansowanych badań z zakresu biologii herpeswirusów podejmowane próby wprowadzenia efektywnych szczepionek przeciwko większości ludzkich herpeswirusów zakończyły się niepowodzeniem. Jedną z przyczyn może być fakt, iż podczas zakażenia herpeswirusami obserwuje się bardzo złożoną odpowiedź immunologiczną, tj. wirusy mogą ingerować w układ odpornościowy gospodarza i wywołać infekcję utajoną – skutkującą przejściem w stan latencji, w przypadku alfaherpeswirusów w zwojach nerwów czuciowych. Niewątpliwą rolę w modulacji odpowiedzi immunologicznej odgrywają **białka wirusowe**, a ostatnie doniesienia literaturowe zwracają także uwagę na rolę uwalnianych przez komórki **pęcherzyków zewnątrzkomórkowych** (ang. *extracellular vesicles*, EVs) w tworzeniu odporności przeciwwirusowej.

Celem pracy doktorskiej było zbadanie interakcji **glikoproteiny B** (gB) wybranych alfaherpeswirusów z **białkami szlaku endosomalno-egzosomalnego oraz cząsteczkami MHC klasy II**, jako składowej układu immunologicznego, aby lepiej scharakteryzować opisany mechanizm oraz podjąć próbę wykazania dodatkowej, immunomodulacyjnej funkcji gB. gB jest białkiem występującym u wszystkich herpeswirusów, a jej jak dotąd najszerzej udokumentowana rola została określona na początkowym etapie infekcji, podczas wnikania wirusa do komórki gospodarza.

Do badania wybrano trzech przedstawicieli alfaherpeswirusów: **wirusa opryszczki pospolitej typu 1** (HSV-1), **bydlęcego herpeswirusa-1** (BoHV-1) i **wirusa pseudowścieklizny** (PRV), co pozwoliło na ocenę stopnia konserwacji ewolucyjnej badanych mechanizmów. Przeprowadzono eksperymenty oparte na wykorzystaniu stabilnych linii komórek ssaczych z konstytutywną ekspresją genów gB

oraz komórek infekowanych wirusami. W uzyskanych liniach komórkowych badano, metodą immunofluorescencji-mikroskopii konfokalnej, możliwość ko-lokalizacji gB z białkami-markerami szlaku endosomalno -egzosomalnego oraz cząsteczkami MHC klasy II. Określono wpływ obecności gB na poziom cząsteczek MHC II na powierzchni komórek. Metodą filtracji żelowej (SEC) oraz ultrawierowania w gradiencie jodksanolu oczyszczono pęcherzyki uwalniane przez linie komórkowe i komórki zainfekowane.

W tym drugim przypadku, rozdzielenie cząstek wirusowych i pęcherzyków stanowiło duże wyzwanie metodologiczne, ze względu na podobne parametry bio-fizyczne obu typów struktur. Ponadto, dokonano próby określenia znaczenia biologicznego inkorporacji białek wirusowych do EVs uwalnianych podczas infekcji na podstawie badania ich zdolności do wiązania przeciwciał wirusowo-specyficznej surowicy oraz testu wychwytywania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z gB przez komórki ssacze (ang. *extracellular vesicles uptake*).

Do najważniejszych wyników tej pracy należy wykazanie inkorporacji dojrzałych form gB do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz różnic w stopniu hamowania cząsteczek MHC klasy II na powierzchni komórek oraz w pęcherzykach przez trzy badane homologii gB. Dodatkowo, po raz pierwszy, scharakteryzowano pęcherzyki uwalniane podczas infekcji wirusami BoHV-1 i PRV, potwierdzając obecność w nich gB.

Uzyskana wiedza na temat interakcji gB wybranych alfaherpeswirusów z białkami szlaku endosomalno-egzosomalnego oraz cząsteczkami MHC klasy II podczas infekcji alfaherpeswirusowej może pomóc w lepszym zrozumieniu immunobiologii herpeswirusów, a przez to przyczynić się do wskazania kierunków w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych i kontroli infekcji wirusowych.

**Herpesviruses** are one of the most widespread pathogens, causing infections in humans, as well as farm and wild animals. These viruses have a unique architecture of the virion. Their genome, in the form of double-stranded DNA, is enclosed in an icosahedral capsid, surrounded by a protein coat named tegument, and a bilayer lipid envelope enriched in viral glycoproteins. The classification of herpesviruses into subfamilies alpha-, beta- and gammaherpesviruses is used to identify the evolutionary relationship, as well as summarize the unique properties of individual members of the *Herpesviridae* family.

Despite the high state of the knowledge and advanced research in the field of herpesvirus biology, attempts to introduce effective vaccines against most human herpesviruses have been unsuccessful. This may be explained by the fact that during the infection with herpesviruses, a very complex immune response is observed: viruses can interfere with the host's immune system and cause latent infection - resulting in a transition to a latency, in the case of alphaherpesviruses, in the sensory nerve ganglia.

**Viral proteins** play an unquestionable role in modulating the immune response, and recent literature reports point to the role of **extracellular vesicles** (EVs) released by cells in the formation of antiviral immunity.

The aim of the doctoral dissertation was to investigate the interaction between **glycoprotein B** (gB) of **selected alphaherpesviruses with proteins of the endosomal-exosomal pathway and MHC molecules class II** as a component of the immune system in order to better characterize the described mechanism and to test the proposed an additional, immunomodulatory, function of gB. gB is a protein found in all herpesviruses, and its most widely documented role so far has been determined at the initial stage of infection, during the entry of the virus into the host cell.

Three representatives of alphaherpesviruses were selected for the study: **herpes simplex virus type 1** (HSV-1), **bovine herpesvirus type 1** (BoHV-1) and **pseudorabies virus** (PRV), which allowed to assess the degree of evolutionary conservation of the examined mechanisms. Experiments based on the use of stable mammalian cell lines with constitutive expression of gB genes and virus-infected cells were carried out. In the obtained cell lines, the possibility of gB colocalization with proteins-markers of the endosomal-exosomal pathway and MHC class II molecules was examined by the immunofluorescence-confocal microscopy. The influence of the presence of gB on the level of MHC II molecules on the cell surface

was determined. Vesicles released by cell lines and infected cells were purified by size exclusion chromatography (SEC) and ultracentrifugation in a gradient of iodixanol.

In case of the second method, the separation of viral particles and vesicles was a major methodological challenge due to the similar bio-physical parameters of both types of structures. In addition, attempts have been made to determine the biological significance of viral protein incorporation to EVs released during infection based on their ability to bind antibodies from a viral-specific serum and an extracellular vesicle capture test from gB by mammalian cells (extracellular vesicles uptake).

One of the most important results of this work is the demonstration of the incorporation of mature forms gB to extracellular vesicles and the differences in the degree of inhibition of MHC class II molecules on the cell surface and in the vesicles by the three studied gB homologs. Additionally, for the first time, the vesicles released during BoHV-1 and PRV infection were characterized, confirming they contain gB.

The knowledge obtained about the interaction of gB of selected alphaherpesviruses with endosomal-exosomal pathway proteins and MHC class II molecules during alphaherpesviral infection may help to better understand the immunobiology of herpesviruses and thus contribute to indicate the direction of the development of new therapeutic strategies and viral infection control.

## 3 WSTĘP

**Endocytoza** to proces, w którym makrocząsteczki i białka powierzchniowe, w tym wirusowe, ulegają transportowi z powierzchni błony komórkowej do wnętrza komórki poprzez jeden z molekularnie odrębnych wyspecjalizowanych systemów.

### 3.1. Szlak endosomalno – egzosomalny

#### 3.1.1 *Endosomalny transport białek*

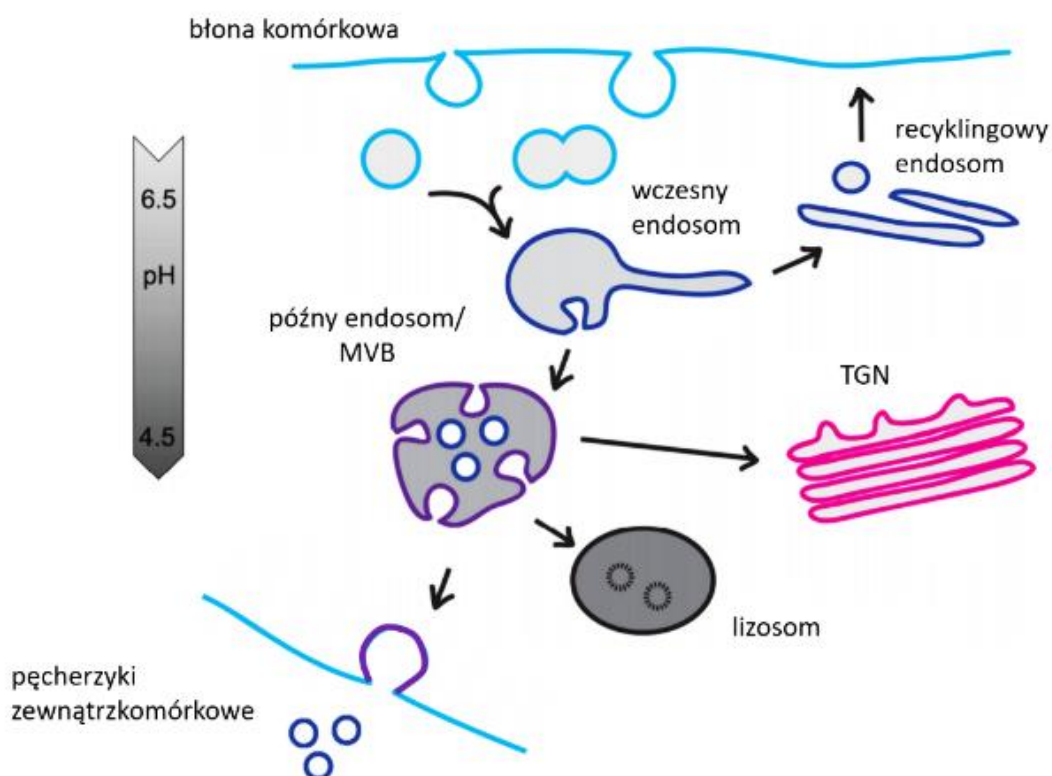
Najszerzej dotąd scharakteryzowany mechanizm endocytny – **klatrynozależny** – zachodzi za pośrednictwem wgłębień błony komórkowej otoczonych białkiem- **klatryną**, które w kolejnych etapach endocytozy są przekształcane w pęcherzyki transportowe. Klatryna nie łączy się bezpośrednio z błoną komórkową, ale poprzez białka adaptorowe (m.in. AP-1, AP-2 czy  $\beta$ -arrestynę), warunkuje transport cząstek z powierzchni błony plazmatycznej i wewnątrzkomórkowej, pomiędzy kompartmentami komórki (Royle, 2006). Endocytoza klatryno-zależna odgrywa ważną rolę, m.in. w internalizacji lipoprotein o małej gęstości i transferyny, po wcześniejszym związaniu się tych cząsteczek z odpowiednimi receptorami w błonie komórkowej (Carpentier i wsp., 1982; Neutra i wsp., 1985).

Endocytoza z udziałem **kaweoli**, zaobserwowana po raz pierwszy ponad 60 lat temu z wykorzystaniem cienkowarstwowej mikroskopii elektronowej (Yamada, 1955), jest drugim szeroko opisanym szlakiem endocytnym. Stwierdzono, że odgrywa ważną rolę w transporcie lipidów (Parton i Simons, 2007). Kaweole są miejscem wgłębienia w błonie komórkowej w kształcie kolby lub litery omega. Badania biochemiczne wykazały dużą ich odporność na detergenty i obecność wysoce hydrofobowych domen błonowych wzbogacone w cholesterol i sfingolipidy (Murata i wsp., 1995; Harder i Simons, 1997). Głównymi białkami strukturalnymi kaweoli są kaweolina-1, kaweolina-2 i kaweolina-3, zlokalizowane w wewnętrznym listku błony komórkowej. Wiążą one cholesterol i, tworząc oligomeryczny kompleks, warunkują względną stabilność opisywanych struktur endocytnych (Kiss i Botos, 2009). Poza udziałem w endocytozie, kaweole pełnią funkcje w przekazywaniu sygnałów komórkowych, regulują metabolizm lipidów i zmian napięcia powierzchniowego komórki (Parton i del Pozo, 2013).

Trzeci mechanizm endocytozy – **niezależny od klatryny** – opisany stosunkowo niedawno (w którym nie wykazano występowania wyraźnego płaszcza białkowego) jest trudno

wykrywalny za pomocą mikroskopii elektronowej, charakteryzuje się opornością na inhibitory endocytozy klatrynozależnej i z udziałem kaweoli. Odgrywa on istotną rolę w transporcie receptorów sygnałowych, cząsteczek adhezyjnych i odżywczych, jak również w regulacji obecności transporterów przezbłonowych na powierzchni błony komórkowej (Elkin i wsp., 2016).

Zinternalizowane z powierzchni błony komórkowej poprzez jeden z opisanych systemów endocytozy cząsteczki znajdują się odtąd w pęcherzyku błonowym nazywanym **wczesnym endosomem** (ang. *early endosome*). Jeśli struktura ta zostanie skierowana z powrotem w kierunku powierzchni komórki, staje się **endosomem krążącym** (recyklingowym, ang. *recycling endosome*). W przeciwnym wypadku wczesny endosom jest przekształcany w **późny endosom/ ciało wielopęcherzykowe** (ang. *late endosome/ MVB* – ang. *multivesicular body*) (**Rycina 1**). Wczesne i późne endosomy różnią się składem białkowym i swoim pH. Lizosomy, ze względu na aktywność H<sup>+</sup>-ATPazy, posiadają niskie pH (~4.5-5.0).



**RYCINA 1. Transport endosomalny** – objaśnienia znajdują się w tekście. (na podstawie Elkin i wsp., 2016, zmienione).

### 3.1.1.1 Tworzenie ciał wielopęcherzykowych (MVBs)

**Ciała wielopęcherzykowe** (MVBs) są jedną z trzech grup endosomów, których cechą charakterystyczną jest obecność **wewnętrznych małych pęcherzyków** (ILVs – ang. *intraluminal endosomal vesicles*), powstałych poprzez wpączkowanie do wnętrza błony MVB. W pełni ukształtowane MVB może:

- a) ulec przemieszczeniu do części *trans* aparatu Golgiego (TGN),
- b) zostać przetransportowane w kierunku powierzchni błony komórkowej, gdzie następuje fuzja z błoną plazmatyczną i uwolnienie zawartości pęcherzyka do przestrzeni międzykomórkowej,
- c) ulec zakwaszeniu i degradacji po połączeniu z lizosomem.

Biogeneza MVB oraz transport cząsteczek do późnych endosomów i kompozycja ILVs są związane z działaniem **kompleksów sortowania endosomalnego** (ESCRT – ang. *endosomal sorting complexes required for transport*) (Piper i Katzmann, 2007). Powszechnie występujące w komórkach eukariotycznych ESCRTs, pośredniczą mechanizmowi kierowania ubikwitynowanych białek wczesnych endosomów do inkorporacji przez ILVs w formujących się MVBs, a następnie degradacji lizosomalnej (Williams i Urbé, 2007). Niezależnie działające kompleksy wchodzące w skład ESCRTs: ESCRT-0, -I, -II i -III są kierowane do endosomów przez interakcje zarówno białko-białko, jak i białko-lipidy, a białkowe komponenty komórkowe związane z ESCRTs mogą pełnić także inne funkcje w komórce, np. TSG101, Alix, CD63.

### 3.1.1.2 Koordynacja szlaku endosomalnego z udziałem białek Rab

**Białka Rab** należą do grupy małych GTPaz, których biochemiczne działanie opiera się na przejściu między stanem aktywnym (ze związanym GTP) i stanem nieaktywnym (ze związanym GDP), katalizowanym przez czynniki wymiany nukleotydów guaniny i białka aktywujące GTPazę. Cykliczny i odwracalny charakter funkcjonowania białek Rab, kontrolowany przestrzennie oraz czasowo, pozwala na regulację szlaku endosomalnego na poszczególnych jego etapach (**Tabela 1**), a także na koordynację transportu pęcherzyków błonowych: od pączkowania do fuzji (Dutta i Donaldson, 2015). Pośród poznanych



dotąd białek Rab około trzy czwarte z nich bierze udział w biogenezie i degradacji endosomów, a także internalizacji do wnętrza komórki i kierowaniu na powierzchnię błony komórkowej receptorów, cząsteczek adhezyjnych czy komponentów transporterów przezbłonowych (Wandinger-Ness i Zerial, 2014).

**TABELA 1. Lokalizacja endosomalna wybranych białek Rab.** (na podstawie Wandinger-Ness i Zerial, 2014, zmienione).

<i>lokalizacja endosomalna</i>	<i>białko Rab</i>					
<b>endosomy wczesne</b>	Rab 4	Rab 13	Rab 20	Rab 22	Rab 35	
	Rab 5	Rab 20	Rab 21	Rab 23		
<b>endosomy krążące</b>	Rab 3	Rab 8	Rab 11	Rab 15	Rab 26	Rab 39
	Rab 6	Rab 10	Rab 14	Rab 17	Rab 37	
<b>endosomy późne</b>	Rab 7	Rab 12	Rab 27	Rab 34	Rab 38	
	Rab 9	Rab 24	Rab 32	Rab 36		

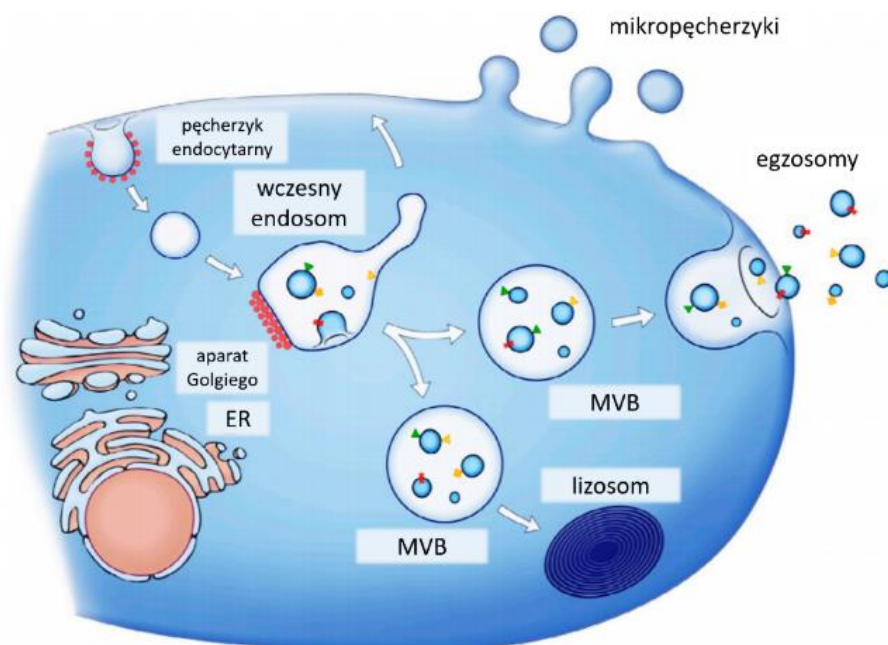
### 3.1.2 Transport cząsteczek MHC klasy II

Cząsteczki **głównego układu zgodności tkankowej klasy II** (ang. *major histocompatibility complex class II, MHC II*) są heterodimerycznymi białkami błonowymi, za pośrednictwem których dochodzi do prezentacji peptydów antygenowych limfocytom T CD4+ i aktywowania swoistej odpowiedzi immunologicznej. Peptydy te, pochodzą z ulegających lizosomalnej degradacji enzymatycznej białek szlaku endocytarnego a same cząsteczki MHC klasy II składają się z dwóch podjednostek –  $\alpha$  i  $\beta$ , z których każda posiada dwie domeny zewnątrzkomórkowe – odpowiednio  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  oraz fragment przezbłonowy i wewnątrzkomórkowy (Castellino, 1997). Cząsteczki MHC klasy II są kodowane przez geny, znajdujące się w regionach: HLA-DP, -DQ, -DR, HLA-DM oraz HLA-DO. Masy cząsteczkowe podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  haplotypu HLA-DR to, odpowiednio, 36 kDa i 27 kDa. Aby móc pełnić swoją funkcję, MHC II muszą przejść przez ścieżkę sekrecyjną z szorstkiego retikulum endoplazmatycznego

(gdzie następuje łączenie podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  oraz dołączanie **łańcucha niezmiennego** – białka **CD74/II** (ang. *invariant chain*) pomiędzy domenami  $\alpha 1$  i  $\beta 1$ , zapobiegającego niespecyficznemu wiązaniu do rowka, w którym na późniejszym etapie umieszczany jest właściwy peptyd antygenowy). W dalszej kolejności cząsteczki zostają przekierowane na szlak endocytarny, gdzie w wydzielonych późnych endosomach, nazywanych **kompartmentem MHC II (MIIC)**, zachodzi dołączenie peptydu antygenowego, a następnie przeniesienie kompleksu na powierzchnię komórki (Garstka i Neefjes, 2013).

### 3.1.3 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako system komunikacji międzykomórkowej

**Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs – ang. extracellular vesicles)** to niejednorodna grupa ograniczonych błoną kulistych struktur pochodzenia komórkowego, powstała na skutek uwolnienia do przestrzeni komórkowej zawartości ciał wielopęcherzykowych (**egzosomy**) lub poprzez pączkowanie błony komórkowej na zewnątrz komórki (**mikropęcherzyki**, **ciałka apoptotyczne**) (Rycina 2) (Raposo i Stoorvogel, 2013).



**RYCINA 2. Biogeneza pęcherzyków zewnątrzkomórkowych** – objaśnienia znajdują się w tekście. (na podstawie Raposo i Stoorvogel, 2013, zmienione).

Wydzielane przez większość typów komórek (w tym roślinnych) pęcherzyki można zaobserwować w płynach ustrojowych, takich jak krew, ślina, mocz, mleko matki, płyn mózgowo-rdzeniowy, gdzie pełnią swoje funkcje zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych (van Niel i wsp., 2018). W hodowlach komórek ssaczych *in vitro* są uwalniane do pożywki hodowlanej.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są obecnie uważane za dodatkowy mechanizm komunikacji międzykomórkowej, zachodzący z udziałem transportu białek, lipidów i kwasów nukleinowych (głównie mikroRNA – miRNA, ale także długich niekodujących RNA – lncRNA i kolistego RNA – cirRNA) (Shao i wsp., 2018). Kierowanie ładunku biologicznie czynnego do EVs zachodzi w sposób powiązany z ich powstawaniem, jednak jest to zjawisko wciąż mało poznane. Odnotowano kilka znanych mechanizmów selektywnych opisanych dla pojedynczych cząsteczek, które można przyporządkować do dwóch grup: zależnej i niezależnej od szlaku działania kompleksów sortowania endosomalnego ESCRT (Anand i wsp., 2019).

Syntenina, zaangażowana w przemieszczanie białek przez błonowych, neuro- i immunomodulację (Philly i wsp., 2015), jest przykładem białka sortowanego do EVs przy udziale ESCRT-III i Alix, co jest możliwe dzięki obecności w jej N-końcowej sekwencji aminokwasowej aż trzech domen późnego składania (ang. *late assembly (L)-domains*) wiążących Alix (Hurley i Odorizzi, 2012). Domeny późnego składania to krótkie sekwencje aminokwasowe występujące w trzech wariantach: P(S/T)AP, PPXY i LYPXnL (gdzie n = 1 lub 3, X to dowolna reszta aminokwasowa), które opisano początkowo jako obecne w białkach wirusowych i pośredniczące w uwalnianiu wirusów osłonkowych poprzez rekrutację ESCRT.

Badania nad mechanizmami sortowania EVs w sposób niezależny od ESCRT skupiają uwagę na udziale w tym procesie sfingolipidów i ich enzymów. Okazuje się, że poza uczestniczeniem w biogenezie EVs, poprzez kształtowanie krzywizny błony oraz wytwarzaniem ceramidu wewnątrz przedziału endocytarnego z udziałem kwaśnych i obojętnych fosfodiesteraz sfingomieliny, sfingolipidy pełnią funkcję w sortowaniu ładunku biologicznego do EVs, m.in. za pośrednictwem sfingozyno-1-fosforanu (Verderio, i wsp., 2018). Dowiedziono także, iż białka mogą być umieszczane w EVs z udziałem tetraspanin CD81 i CD9, które pośredniczą w kierowaniu do EVs przez interakcje z sekwencjami domen cytoplazmatycznych (Villarroya-Beltri, i wsp., 2014).

W przypadku szeroko scharakteryzowanej obecności RNA w EVs, wykorzystanie multidyscyplinarnych narzędzi badawczych wykazało istnienie aktywnego systemu kierowania kwasów nukleinowych do pęcherzyków za pomocą białek wiążących RNA (ang. *RNA-binding proteins*, RBPs) (Fabbiano i wsp., 2020).

Uwolnione przez komórkę donorową pęcherzyki ulegają internalizacji do komórki-biorcy, poprzez fuzję z błoną plazmatyczną, szlaki endocytarne lub z udziałem tratw lipidowych (Mulcahy i wsp., 2014). Mechanizm pobierania EVs może zależeć od powierzchniowej kompozycji białkowej zarówno pęcherzyka, jak i komórki docelowej. Niektóre z takich zależności są analogiczne jak w przypadku wirusowych strategii wnikania do komórki gospodarza na zasadzie interakcji ligand-receptor (van Dongen i wsp., 2016).

Wraz z rosnącym zainteresowaniem badaniami nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi, konieczne okazało się ujednoczenie nomenklatury oraz wspólnych standardów i metod warsztatu laboratoryjnego (Lötvall i wsp., 2014; Witwer i wsp., 2017; Théry i wsp., 2018).

Przyjęte nazewnictwo oparte zostało o kryterium: biogenezy, wielkości i obecności cząsteczek markerowych opisywanych struktur (**Tabela 2 i Rycina 3**) a na jego podstawie wśród EVs wyróżnić można trzy główne grupy: **małe pęcherzyki – egzosomy, średnie pęcherzyki – mikropęcherzyki** oraz **największe – ciała apoptotyczne**. Podział ten nie uwzględnia informacji na temat typu, pochodzenia, fazy cyklu komórkowego czy też stanu transformacji nowotworowej badanej komórki ze względu na wydzielane EVs, co wiąże się z możliwością wprowadzania dodatkowych nazw zwyczajowych i sugeruje występowanie subpopulacji, różniących się składem i funkcją (György i wsp., 2011; Witwer i Théry, 2019).

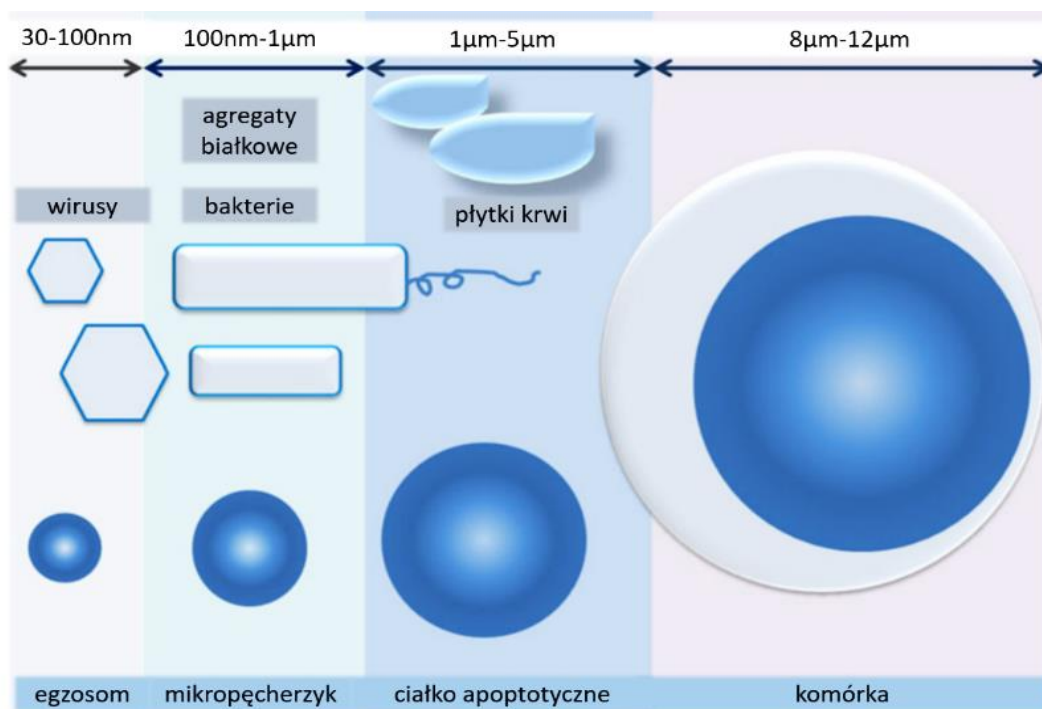
Białka, które występują w EVs w większej ilości niż w innych kompartmentach komórkowych nazywamy markerami egzosomów, mikropęcherzyków lub ciałek apoptotycznych. Różne subpopulacje EVs mogą posiadać te same markery, np. zależnie od typu komórek produkujących białka CD9 i CD63 mogą one występować w błonach egzosomów i mikropęcherzyków. Z tego powodu oraz ze względu na pokrywające się czasami graniczne zakresy wielkości pęcherzyków, towarzystwo naukowe ISEV (ang. *International Society for Extracellular Vesicles*) rekomenduje stosowanie ogólnej nazwy EVs zamiast nazw subpopulacji.

**TABELA 2. Klasyfikacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.** (na podstawie György i wsp., 2011, zmienione).

	<b>małe pęcherzyki – egzosomy (ang. <i>exosomes</i>)</b>	<b>średnie pęcherzyki – mikropęcherzyki, ektosomy (ang. <i>microvesicles,</i> <i>ectosomes</i>)</b>	<b>duże pęcherzyki – ciała apoptotyczne (ang. <i>apoptotic bodies</i>)</b>
<b>pochodzenie komórkowe/ sposób uwalniania z komórki</b>	uwolnienie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej zawartości MVBs	pęczkowanie błony plazmatycznej na zewnątrz komórki	wydzielanie pęcherzyków przez komórkę ulegającą apoptozie
<b>wielkość</b>	50-150 nm	0.1-1 $\mu\text{m}$	> 1 $\mu\text{m}$
<b>cząsteczki markerowe</b>	tetraspaniny - CD63/ CD81/ CD9, Alix, TSG101, flotylina-2	czynnik tkankowy i markery specyficzne dla komórek	obecność fragmentowanego DNA

Jak dotąd, opracowano kilka technik izolacji i oczyszczania EVs (**Tabela 3**). Wybór optymalnej procedury izolacji, ze względu na różnice w zasadzie działania stosowanych metod oraz ich charakterystykę i ograniczenia, zależy od rodzaju wyjściowego materiału biologicznego, subpopulacji EVs będącej przedmiotem zainteresowania i przeznaczenia eksperymentalnego oczyszczonych pęcherzyków (Witwer i wsp., 2013; Coumans i wsp., 2017).

Charakterystyka morfologiczna pęcherzyków komórkowych, pozwalająca na wizualizację i oznaczenie wielkościowe, jest możliwa dzięki zastosowaniu mikroskopii elektronowej, mikroskopii sił atomowych oraz technice dynamicznego rozpraszania światła (DLS - ang. *dynamic light scattering*). Ponadto, analiza śledzenia nanocząstek (NTA - ang. *nanoparticle tracking analysis*) oraz przestrajalne rezystancyjne wykrywanie impulsu (TRPS - ang. *tunable resistive pulse sensing*), dostarczają informacje o stężeniu i ładunku powierzchniowym EVs. Kompozycja biochemiczna jest analizowana poprzez



**RYCINA 3. Porównanie wielkości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych względem innych struktur biologicznych.** (na podstawie György i wsp., 2011, zmienione).

cytometrię przepływową, barwienie przeciwciałami z cząstkami złota w połączeniu z mikroskopią elektronową oraz metody immunoenzymatyczne (**Tabela 4**).

W oparciu o przeprowadzone dotąd badania nad EVs, dotyczące ich znaczenia biologicznego oraz potencjalnego zastosowania diagnostycznego bądź terapeutycznego, powstały bazy danych: ExoCarta, EVpedia oraz Vesiclepedia zawierające skatalogowane informacje na temat materiału biologicznego transportowanego za pośrednictwem EVs (Kim i wsp., 2015; Kalra i wsp., 2012). Platforma EV-track umożliwia z kolei dokonanie ewaluacji opublikowanych doniesień naukowych na podstawie zgodności z zastosowaniem minimalnych wymagań warsztatu badawczego (van Deun i Hendrix, 2017; EV-TRACK Konsorcjum, Van Deun, Mestdagh i wsp., 2017).

**TABELA 3. Metody izolacji i oczyszczania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.** (na podstawie Chiriacò i wsp., 2018, zmienione).

<i>metoda izolacji EVs</i>	<i>wykorzystana technika izolacji</i>	<i>charakterystyka</i>
<b>ultrawiórowanie/ ultrawiórowanie w gradiencie jodksanolu (Optiprep®)</b>	rozdziół ze względu na gęstość, wielkość i kształt cząstek	powszechnie stosowana, wystandaryzowana metoda; możliwa izolacja subpopulacji EVs według gęstości przez wirowanie w gradiencie Optiprep®
<b>chromatografia SEC (ang. <i>size exclusion chromatography</i>)</b>	filtracja żelowa w oparciu o wielkość cząstek	wysoka wydajność, czystość i powtarzalność; zachowana integralność i aktywność biologiczna EVs
<b>precypitacja z wykorzystaniem polimerów</b>	wytrącanie za pomocą sieciowania w polimerach o zmiennej rozpuszczalności, np.: (glikol polietylenowy, komercyjnie dostępne zestawy: ExoQuick™ - Systems Biosciences) i Total Exosome Isolation™ - Life Technologies)	wysoka wydajność i skuteczność z małej ilości materiału wyjściowego; ochrona bioaktywności; istnieje ryzyko współstrącania zanieczyszczeń białkowych i polimeru
<b>techniki immunopowinowactwa</b>	oczyszczanie przy użyciu kulek magnetycznych sprzężonych z przeciwciałami skierowanymi bezpośrednio przeciwko specyficznym markerom powierzchniowym	wysoka specyficzność i czystość materiału wyjściowego, możliwa izolacja subpopulacji EVs; niska wydajność; ryzyko problemów z oddzieleniem złoża od pęcherzyków

**TABELA 4. Metody wykorzystywane do charakterystyki fizyko-biochemicznej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.** (na podstawie Chiriaco i wsp., 2018, zmienione).

<i>metoda charakterystyki fizyko-biochemicznej EVs</i>	<i>uzyskiwana informacja</i>
<b>transmisyjna i kriogeniczna mikroskopia elektronowa</b>	morfologia i średnica EVs
<b>mikroskopia sił atomowych</b>	mikroskopowy obraz 3D powierzchni EVs
<b>technika dynamicznego rozpraszania światła DLS (ang. <i>dynamic light scattering</i>)</b>	dystrybucja EVs ze względu na wielkość cząstek
<b>analiza śledzenia nanocząstek NTA (ang. <i>nanoparticle tracking analysis</i>)</b>	wizualizacja, analiza wielkości i stężenia EVs, możliwość analizy fluorescencji stosowanych barwników i przeciwciał z fluorofortami
<b>przestrajalne rezystancyjne wykrywanie impulsu TRPS (ang. <i>tunable resistive pulse sensing</i>)</b>	analiza wielkości, stężenia i ładunku powierzchniowego EVs
<b>cytometria przepływowa</b>	obecność lub brak białek markerowych, profil białkowy, oznaczenie ilościowe
<b>ELISA</b>	obecność lub brak białek markerowych, oznaczenie ilościowe
<b>Western blotting</b>	obecność lub brak białek markerowych, profil białkowy, oznaczenie ilościowe

### 3.1.4 Krzyżowanie się szlaku endosomalno – egzosomalnego z cyklem replikacyjnym wirusów

Wirusy wykorzystują szlak biogenezy EVs w początkowej fazie infekcji, replikacji, rozprzestrzenianiu się do sąsiednich komórek i modulowaniu przeciwwirusowej odpowiedzi immunologicznej. EVs wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej podczas aktywnej infekcji wirusowej mogą oddziaływać w trojaki sposób. Poza tym, że mogą stać się bezpośrednio cząstkami infekcyjnymi, możliwy jest także ich wpływ na sąsiednie komórki, czyniący je bardziej podatnymi na infekcje.



Co ciekawe, zaobserwowano również mechanizm oparty na pęcherzykach uwalnianych przez komórki zainfekowane, niosący pozytywny efekt w walce z infekcją wirusową, przez wzmaganie stanu zapalnego zaindukowanym przez EVs wydzielaniem cytokin w niezainfekowanych komórkach, obecnych w pobliżu miejsca zakażenia. Poprzez podobieństwo i wzajemne nakładanie się szlaku endosomalno egzosomalnego z cyklem replikacyjnym wielu wirusów, jest możliwe powstawanie EVs zawierających białka, RNA, DNA tych patogenów, a nawet całe wiriony. W przypadku retrowirusów, rabdowirusów, filowirusów, arenawirusów, paramyksowirusów, ortomyksowirusów, herpeswirusów (m.in. ludzki wirus niedoboru odporności – HIV, wirus zapalenia wątroby typu A – HAV, wirus zapalenia wątroby typu C – HCV, grypa i Ebola) proces dojrzewania wirionów jest powiązany z białkami, które kontrolują tworzenie MVBs (ESCRT, Rab, CD63) lub mechanizm odpączkowania pęcherzyków z błony plazmatycznej (Altan-Bonnet, 2016; Toledo Martins an Lysangela i Alves, 2020).

Na przykładzie alfaherpeswirusów stwierdzono, iż białko enzymatyczne – ATPaza Vps4 – wchodząca w skład kompleksu ESCRT-III i zaangażowana w formowanie pęcherzyków luminalnych, ma zasadnicze znaczenie dla składania dojrzałych cząstek wirusa opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1 – ang. *herpes simplex virus 1*) w cytoplazmie. Ponadto wykazano, że ESCRT-III przy współudziale Vps4 hamuje replikację HSV-1 poprzez blokowanie procesu nabywania osłonki przez wirusa. Białko to, jest obecne w dojrzałych wirionach, jak i egzosomach, podobnie jak Alix i TSG101, które są jednak wykrywane na niższym poziomie, ale przyczyniają się do namnażania HSV-1 (Pawliczek i Crump, 2009).

Innym przykładem krzyżowania się szlaku endosomalno – egzosomalnego z cyklem replikacyjnym herpeswirusów jest udział białka CD63. Tetraspanina ta, opisana jako ważny komponent endosomalnego sortowania białek i powstawania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, reguluje sygnalizację wewnątrzkomórkową i kierowanie na ścieżkę egzosomalną białka LMP1 wirusa EBV. CD63 pełni istotną funkcję w mechanizmie koordynacji procesów autofagii i tworzenia endosomów regulujących ilość LMP1 w komórce, a przez to wpływających na cykl replikacyjny wirusa EBV (Hurwitz i wsp., 2018). Przykłady pozostałych cząsteczek powiązanych z egzosomami w infekcji herpeswirusowej zostały przedstawione w **Tabeli 5**.

**TABELA 5.** Skrócona systematyka podrodzin *Herpesviridae* z podaniem przykładów cząsteczek powiązanych z egzosomami podczas infekcji herpeswirusowej. (na podstawie Liu i wsp., 2017, zmienione).

<i>podrodzina Herpesviridae</i>	<i>gatunek</i>	<i>cząsteczki powiązane z egzosomami podczas infekcji herpeswirusowej</i>
<b>alfaherpeswirusy</b>	HSV-1	STING, miR-H28, miR-H29, ESCRT-III kompleks, Vps4, ALIX, TSG101, gB, HLA-DR (MHC klasy II), CD63
<b>betaherpeswirusy</b>	HCMV	TGN 46, aneksyna I, CD63, EEA1, receptor transferyny, kationo-niezależny receptor mannozo-6-fosforanu
	HHV-6	CD63, cząsteczki MHC klasy I
<b>gammaherpeswirusy</b>	EBV	LMP1, CD63, miRNAs, Fas ligand, EBERs i inne niekodujące RNA, NF-κB, integryny
	KSHV	IFI16, IL-1β

### 3.2 Glikoproteina B wybranych przedstawicieli alfa herpeswirusów, jej funkcje i oddziaływanie z białkami komórki gospodarza

#### 3.2.1 Charakterystyka podrodziny *Alphaherpesvirinae*

**Alfa herpeswirusy** są powszechnie występującymi czynnikami chorobotwórczymi ludzi i zwierząt, zarówno hodowlanych, jak i dziko żyjących. Wspólnymi cechami charakterystycznymi są: stosunkowo krótki cykl replikacyjny, ograniczony zakres gospodarza i neurotropizm oraz możliwość przejścia podczas infekcji w stan latencji – uśpienia w komórkach układu nerwowego, zwykle w zwojach nerwów czuciowych (Muylkens i wsp., 2007).

Zwykle wąski tropizm gatunkowy oraz podobieństwo do pozostałych przedstawicieli *Herpesviridae* czynią alfa herpeswirusy cennym modelem badawczym, biorąc pod uwagę fakt, iż spośród zidentyfikowanych jak dotąd gatunków podrodziny *Alphaherpesvirinae*, osiem z nich prowadzi do zakażeń u ludzi (Maclachlan i Dubovi, 2011). Infekcja wirusowa może zachodzić asymptotycznie lub prowadzić do rozwinięcia miejscowych objawów klinicznych i stanów zapalnych,

mogących stać się przyczyną chorób wielonarządowych, wymagających leczenia farmakologicznego. W przypadku hodowli zwierzęcych aktywne infekcje wirusowe pociągają za sobą ryzyko strat ekonomicznych.

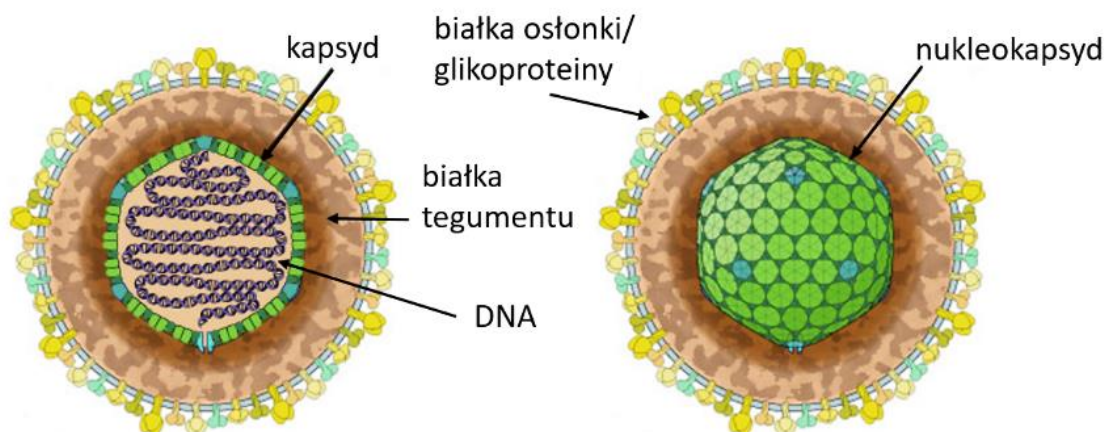
### *3.2.1.1 Pozycja systematyczna wybranych alfaherpeswirusów, morfologia wirionu i organizacja genomu*

HSV-1, bydlęcy herpeswirus 1 (BHV-1, BoHV-1) oraz wirus pseudowścieklizny – świński herpeswirus wywołujący u zwierząt chorobę Aujeszky'ego (PRV), są reprezentantami rzędu *Herpesvirales*, rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *Alphaherpesvirinae* (Tabela 6). Alfaherpeswirusy są blisko spokrewnione z przedstawicielami dwóch pozostałych podrodziny *Herpesviridae* – *Betaherpesvirinae* i *Gammaherpesvirinae* – do których należą, m.in. ludzki wirus cytomegalii (HCMV/HHV-5), wirus rumienia nagłego (HHV-6) – zaliczane do betaherpeswirusów oraz onkogenne gammaherpeswirusy – wirus Epsteina-Barr (EBV/HHV 4) i wirus mięsaka Kaposiego (KSHV/HHV-8).

Morfologia wirionu i organizacja genomu na przykładzie BoHV-1 jest zgodna z ogólnym schematem budowy cząstki wirusowej członków podrodziny *Alphaherpesvirinae* i rodziny *Herpesviridae* (Rycina 4). BoHV-1 jest stosunkowo dużym wirusem (średnica wirionu wynosi ok. 100 nm) o genomie w postaci linearnego dwuniciowego DNA, zamkniętego w ikozaedralny kapsyd otoczony tegumentem (strukturą białkową charakterystyczną dla herpeswirusów znajdującą się na zewnątrz nukleokapsydu) oraz dwuwarstwą lipidową (pochodząca z pęcherzyka transportowego komórki gospodarza), w której są zakotwiczone wirusowe glikoproteiny (Lobanov i wsp., 2010).

**TABELA 6. Skrócona nowoczesna systematyka podrodziny alfaherpeswirusów w obrębie rzędu *Herpesvirales*.**  
(na podstawie: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>).

<b>Rząd</b>	
<i>Herpesvirales</i>	
<b>Rodzina</b>	
<i>Herpesviridae</i>	
<b>Podrodzina</b>	
<i>Alphaherpesvirinae</i>	
<b>Rodzaj</b>	
<i>Iltovirus</i>	
<b>Gatunek</b>	<i>Gallid alphaherpesvirus 1 (GaHV-1)</i>
<i>Mardivirus</i>	
<b>Gatunek</b>	<i>Gallid alphaherpesvirus 2 (GaHV-2)</i>
<i>Scutavirus</i>	
<b>Gatunek</b>	<i>Chelonid alphaherpesvirus 5 (ChHV5)</i>
<i>Simplexvirus</i>	
<b>Gatunek</b>	<i>Human alphaherpesvirus 1 (HSV-1)</i> <i>Human alphaherpesvirus 2 (HSV-2)</i>
<i>Varicellovirus</i>	
	<i>Human herpesvirus 3/ Varicella zoster virus (HHV-3, VZV)</i>  <i>Bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1, BHV-1)</i> <i>Suid alphaherpesvirus 1/ Pseudorabies Virus (SuH-1, PRV)</i>
<i>Betaherpesvirinae</i>	
<i>Gammaherpesvirinae</i>	



**RYCINA 4. Schemat wirionu alfaherpeswirusa.** (źródło: [https://viralzone.expasy.org/176?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/176?outline=all_by_species)).

Genom BoHV-1, o całkowitej wielkości 135,5 kpz, reprezentuje klasę D, co wskazuje, iż obejmuje on dwa regiony, określane jako: unikalny długi – U<sub>L</sub> (ang. *unique long*) oraz unikalny krótki – U<sub>S</sub> (ang. *unique short*), – otoczony przez sekwencje powtórzeń odwróconych wewnętrznych (ang. *internal repeats* – IR) i terminalnych (ang. *terminal repeats* – TR). W trakcie replikacji region UL może zmieniać orientację względem US, co warunkuje funkcjonowanie genomu aż w czterech izoformach (Muylkens i wsp., 2007).

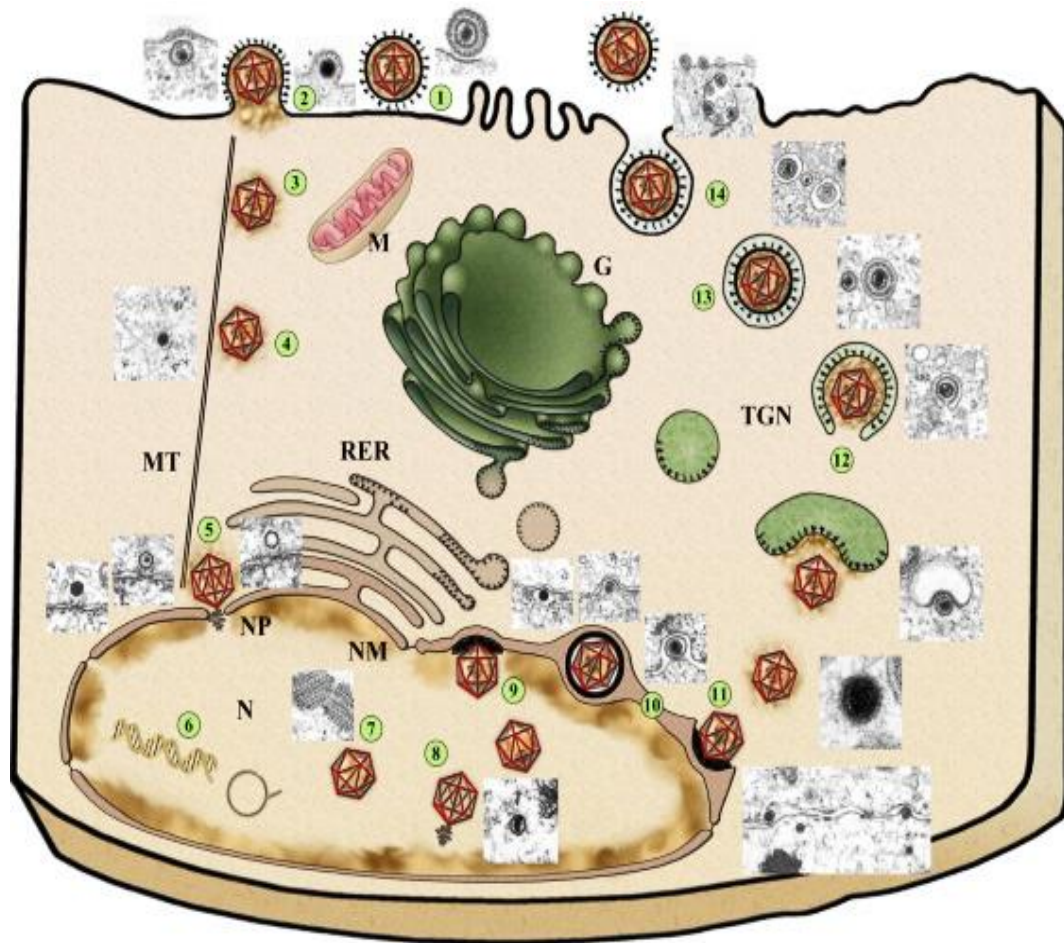
Kompletna zdeponowana sekwencja genomu BoHV-1 w bazie GenBank (Schwyzer i wsp., 1997) pozwala na identyfikację (do tej pory) 73 funkcjonalnych otwartych ramek odczytu. Zestaw genów BHV-1 został podzielony na dwie kategorie ze względu na wpływ delekcji wybranego genu na zdolność powstałego w ten sposób mutantu do namnażania się w kulturach komórkowych. Stąd, geny z grupy niezbędnych (obligatoryjnych) (ang. *essential*) – odpowiedzialne za utrzymanie procesu replikacji, determinują przerwanie procesu namnażania, podczas gdy delekcja któregośkolwiek z genów nieobligatoryjnych (ang. *non-essential*) nie skutkuje efektem blokującym cykl replikacyjny, może natomiast w niektórych przypadkach zmniejszyć wydajność powstawania dojrzałych cząstek wirusowych.

Większość genów, których nazwy zostały ustalone na podstawie ich odpowiedników u wirusa opryszczki pospolitej (HSV-1) (Manservigi i Cassai, 1991), koduje białka zaangażowane w metabolizm kwasów nukleinowych, syntezę DNA i modyfikacje

białek (Roizman i Pellet, 2001). Funkcje strukturalne pełnią co najmniej 33 białka, a 10 z nich stanowią glikoproteiny. Sekwencje kodujące glikoproteiny: gK (gen UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10) i gL (UL1) znajdują się w obrębie regionu U<sub>L</sub>, natomiast pozostałe są zlokalizowane w regionie U<sub>S</sub> – gG (UL4), gD (UL6), gI (US7) i gE (US8). Wyjątkowo w przypadku BoHV-1 produkt genu UL49.5 nie ulega glikozylacji podczas obróbki posttranslacyjnej, jednak białko to posiada swoje glikozylowane homologi u innych herpeswirusów i w bazie GenBank nazwane jest glikoproteiną N (Muylkens i wsp., 2007).

### 3.2.1.2 Cykl replikacyjny alfaherpeswirusów

Model replikacji alfaherpeswirusów został poznany najbardziej dokładnie na przykładzie HSV-1 i przebiega on w sposób podobny dla wszystkich alfaherpeswirusów (**Rycina 5**). W pierwszym etapie, glikoproteiny: gB i/lub gC, występujące na powierzchni osłonki wirusowej, wiążą się z resztami cukrowymi siarczanu heparanu zlokalizowanymi w błonie komórkowej gospodarza, tworząc wiązanie o słabym powinowactwie. W dalszej kolejności dochodzi do utworzenia stabilnego wiązania pomiędzy białkiem gD i heterodimerem gH/gL a receptorami komórkowymi, wśród których zidentyfikowano molekuly należące do czterech klas, m.in. należące do rodziny czynnika martwicy nowotworów białko HVEM (ang. *herpesvirus entry mediator*), białka adhezyjne: nektynę-1 lub nektynę-2, czy też modyfikowaną część siarczanu heparanu. Ukończenie powyższych etapów umożliwia fuzję osłonki wirusowej z błoną komórki permisywnej, uwolnienie nukleokapsydów do cytoplazmy, oddzielenie warstwy tegumentu i transport, za pośrednictwem motorycznego kompleksu dyneinowego związanego z mikrotubulami, w kierunku przestrzeni okołojądrowej komórki. Tam kapsydy lokalizują się w pobliżu porów jądrowych, przez które wirusowy DNA jest uwalniany do wnętrza jądra komórkowego i ulega cyrkularyzacji.



**RYCINA 5. Schemat cyklu replikacyjnego alfaherpeswirusa.** N – jądro komórkowe, NP – pory jądra komórkowego, NM – błony jądra komórkowego, RER – retikulum endoplazmatyczne szorstkie, MT – mikrotubule, M – mitochondrium, G – aparat Golgiego, TGN – część *trans* aparatu Golgiego (na podstawie Mettenleiter i wsp., 2009).

Transkrypcja, synteza białek wirusowych i replikacja wirusowego DNA mają charakter kaskadowy. W pierwszej kolejności, indukowane białkami tegumentu (m.in. VP16 – znane jako transaktywator genów  $\alpha$ , vhs – białko o właściwościach endorybonukleazy) i przy udziale komórkowej polimerazy RNA II, są transkrybowane geny  $\alpha$ , zwane natychmiastowo wczesnymi (IE – ang. *immediate-early*). Ich produkty pełnią funkcje regulatorowe i są niezbędne do ekspresji genów wczesnych oraz późnych. W przeciwieństwie do innych herpesvirusów, wirus PRV posiada tylko jeden gen IE, który jest transkrybowany w fazie natychmiastowo-wczesnej. Następnie transkrypcji ulegają geny  $\beta$  – wczesne (E – ang. *early*), związane głównie z metabolizmem kwasów nukleinowych. Ich pojawienie się w zakażonej komórce sygnalizuje początek syntezy wirusowego DNA



i transkrypcję genów późnych –  $\gamma$  (L – ang. *late*), kodujących białka strukturalne oraz glikoproteiny osłonki (Mettenleiter, 2000; Weir, 2001).

Model replikacji materiału genetycznego alfaherpeswirusów zakłada, iż kolistą formą genomu służy jako matryca do pierwszej rundy replikacji typu *theta*, rozpoczynającej się w miejscu inicjacji replikacji. W dalszej kolejności, poprzez nieznaną dotąd mechanizm, następuje zmiana dwukierunkowej replikacji na model toczącego się koła, generujący powstanie konkatomerycznej formy DNA o złożonej, rozgałęzionej strukturze. Późniejsza rekombinacja pomiędzy konkatomerami prowadzi do formowania i uszeregowania różnych konfiguracji regionów UL i US. Powstałe w wyniku replikacji DNA konkatomery, po podziale na niezależne jednostki, są kierowane do kapsydów i w formie nukleokapsydu transportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie zostają opłaszczone warstwą tegumentu. Nabywanie ostatecznej lipidowej osłonki wirusowej zachodzi poprzez pączkowanie niedojrzałych form wirionów do pęcherzyków systemu *trans*-Golgi (TGN - ang. *trans Golgi network*) lub endosomów, w których błonie znajdują się już dojrzałe glikoproteiny wirusowe (Enquist i wsp., 1998; Mettenleiter i wsp., 2002). Również z udziałem tych struktur następuje przemieszczenie dojrzałych cząstek wirusowych i ich uwolnienie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w wyniku fuzji pęcherzyka transportującego z błoną komórkową. Możliwe jest rozprzestrzenianie się wirusa do otaczających komórek.

### *3.2.1.3 Odpowiedź immunologiczna i wirusowe mechanizmy ingerencji w infekcji alfaherpeswirusowej*

Reakcja układu immunologicznego gospodarza na infekcję wirusową rozpoczyna się w momencie pojawienia się wirusa w organizmie i początkowych etapach infekcji. Zaangażowana na etapie zwalczania zakażenia odpowiedź nieswoista obejmuje aktywację makrofagów, neutrofilów, granulocytów oraz produkcję interferonu typu II i prowadzi do powstania miejscowego stanu zapalnego. W dalszym etapie istotną rolę odgrywa odpowiedź nabyta, zależna od limfocytów T i B, a przeciwciała neutralizujące, skierowane głównie przeciwko wirusowym glikoproteinom (gB, gC, gD i gE), hamują rozprzestrzenianie się wirusa (Babiuk i wsp., 1996). Mechanizmy te nie są jednak w stanie całkowicie wyeliminować patogenu, który po pierwotnej infekcji pozostaje



w organizmie na całe życie. Dzieje się tak ze względu na fakt rozwinięcia przez alfaherpeswirusy strategii immunomodulacyjnych i bezpośredniego unikania rozpoznania przez system immunologiczny gospodarza poprzez, m.in.:

- a) wykształcenie infekcji utajonej – latentnej
- b) zwracanie wysoko immunogennych glikoprotein wirusowych z powierzchni błony komórkowej zainfekowanej komórki:
  - indukowana przez wiązanie specyficznych przeciwciał antywirusowych, internalizacja glikoprotein z powierzchni monocytów przy udziale gB i gD (Favoreel i wsp. 2002; Ficińska i wsp. 2005)
- c) indukowane aktywnością białek wirusowych ingerowanie w proces prezentacji antygeny za pomocą cząsteczek MHC klasy I:
  - blokowanie kompleksu białkowego transportera związanego z przetwarzaniem antygeny (TAP ang. *transporter associated with antigen processing*) należącego do rodziny transporterów z kasetą wiążącą ATP, związanego z procesem prezentacji antygeny przez cząsteczki MHC klasy I (Tomazin i wsp., 1998; Koppers-Lalic i wsp. 2005; Koppers-Lalic i wsp., 2008; Verweij i wsp., 2015; Matschulla i wsp., 2017)
  - zmniejszenie ilości syntetyzowanych cząsteczek MHC klasy I jako rezultat działania białka UL41 (vhs) posiadającego właściwości endorybonukleazy (Hinkley i wsp., 2000)
  - kierowanie cząsteczek MHC I do degradacji (van de Weijer i wsp., 2014; van den Boomen i Lehner, 2015; van de Weijer i wsp., 2015)
  - zaburzenie transportu wewnątrzkomórkowego cząsteczek MHC I (Abendroth i wsp., 2001; Park i wsp., 2004; Zuo i wsp., 2009; Griffin i wsp., 2010; Schuren i wsp., 2016)
- d) ingerencja w aktywność immunoproteasomu (Khan i wsp., 2004; van de Weijer i wsp., 2015)

- e) hamowanie produkcji białek komórki gospodarza:
- oddziaływanie za pomocą wirusowego mikroRNA na transkrypty komórki gospodarza i wirusowe (Piedade i Azevedo-Pereira, 2016),
  - hamowanie transkrypcji genów kodujących interferony klasy I przez białko BICP0 (Saira i Jones, 2006)
  - ingerowanie za pomocą białek o aktywności RNAzy – BGLF5 (Griffin i wsp., 2010) lub endonukleazy alkalicznej – SOX (Griffin i wsp., 2010)
- f) bezpośrednio oddziaływanie na elementy układu immunologicznego gospodarza:
- zaburzenie funkcjonowania makrofagów, limfocytów i komórek NK (Tikoo i wsp., 1995; Reyburn i wsp., 1997; Griffin i wsp., 2010),
  - kierowanie limfocytów CD4+ na drogę apoptozy (Babiuk i wsp., 1996; Winkler i wsp., 1999),
  - interakcja gC z C3b - składową układu dopełniacza – blokowanie ścieżki alternatywnej (Huemer i wsp., 1993; Turin i wsp., 1999),
  - wiązanie chemokin przez gG (Bryant i wsp., 2003)
  - aktywność immunosupresyjna za pomocą tzw. wirokin – homologów cytokin (Spencer i wsp., 2002; Griffin i wsp., 2010)
  - wiązanie przeciwciał przez kompleks gE/gI pełniący funkcję receptora Fc $\gamma$ R (Ndjamien I WSP., 2014)

Ponadto, wywołane infekcją wirusową środowisko immunosupresyjne zwiększa podatność organizmu gospodarza na infekcje wtórne (bakteryjne, grzybowe, innymi wirusami) i rozwój chorób współtowarzyszących.

### 3.2.1.4 Wykorzystanie szlaków endocytozy przez wirusowe glikoproteiny podczas cyklu replikacyjnego

Występujące w komórkowych białkach błonowych **sekwencje endocytozy**, takie jak motywy: **tyrozynowy** (YXXΦ) i **dileucynowy** (LL) oraz **klaster kwaśnych aminokwasów** odgrywają kluczową rolę w kontrolowaniu procesów komórkowych, w tym endocytozy klatrynozależnej, sortowaniu białek i aktywacji szlaków sygnałowych. Doniesienia literaturowe dowodzą, iż wiele spośród białek herpeswirusowych zawiera w swojej sekwencji opisywane motywy endocytozy (Favoreel i wsp., 2006), gdyż szlaki endocytozy są wykorzystywane przez wirusowe glikoproteiny w zainfekowanej komórce podczas cyklu replikacyjnego (de Zarate i wsp., 2007). Wykazano, iż endocytoza herpeswirusowych glikoprotein może tłumaczyć proces unikania odpowiedzi immunologicznej ze strony gospodarza (Brideau i wsp., 2000; Favoreel i wsp., 2002) i sprzyjać wewnątrzkomórkowemu transportowi glikoprotein i białek osłonki w miejsce końcowego montażu dojrzałych wirionów (po internalizacji w błonie komórkowej zainfekowanej komórki białka są zawracane do jej wnętrza i gromadzone w części *trans* aparatu Golgiego (TGN) lub utworzonych pęcherzykach transportowych) (de Zarate i wsp., 2007) (**Tabela 7**).

Najczęściej spotykany motyw tyrozynowy należy do rodziny YXXΦ, gdzie Y stanowi resztę tyrozyny, X resztę dowolnego aminokwasu, a Φ resztę wysoce hydrofobowego aminokwasu. Według danych literaturowych motyw tyrozynowy zlokalizowany w domenie cytoplazmatycznej białek wirusowych jest zaangażowany w szereg mechanizmów, takich jak: endocytoza klatrynozależna (interakcja z białkiem adaptorowym AP-2), transport białek z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego (prawdopodobnie poprzez maskowanie sygnału retencji w ER lub oddziaływanie z białkiem COP-II), sortowanie bazolateralne (udział białka adaptorowego AP-1B), sortowanie wirionów do aksonów, przekazywaniu sygnałów (prawdopodobnie dzięki fosforylacji przez kinazę tyrozynową). Zaobserwowano, iż heterooligomery białek wirusowych również mogą ulegać endocytozie w oparciu o choć jeden motyw tyrozynowy obecny w polipeptydzie tworzącym kompleks (przykład stanowi gE VZV i PRV, której sekwencja YXXΦ powoduje endocytozę kompleksu gE/gI (Alconada i wsp., 1998; Tirabassi i Enquist, 2000).

TABELA 7. Lokalizacja i funkcje motywu tyrozynowego wybranych białek wirusowych.

<i>motyw endocytozy</i>	<i>homolog wirusowy</i>	<i>funkcja</i>	<i>odnośnik literaturowy</i>
<b>motyw tyrozynowy</b>	gB HSV, PRV, VZV	endocytoza z powierzchni błony komórkowej	(Heineman i Hall, 2001; Favoreel i wsp., 2002; Fan i wsp., 2002; de Zarate i wsp., 2007)
	gD PRV		(Ficińska i wsp., 2005)
	gE PRV, VZV		(Alconada i wsp., 1996; Olson i Grose, 1997; Tirabassi i Enquist, 2000)
	gH VZV		(Pasięka i wsp., 2003)
	gB HSV, VZV	transport z ER do aparatu Golgiego	(Favoreel i wsp., 2006)
	gB PRV	sortowanie bazolateralne	(Favoreel i wsp., 2006)
	gE PRV	motyw sygnałowy	(Favoreel i wsp., 2006)
	US9 PRV	sortowanie do aksonów	(Favoreel i wsp., 2006)
<b>motyw dileucynowy</b>	gB VZV i PRV	endocytoza białek wirusowych i ich prawidłowa lokalizacja w obrębie aparatu Golgiego	(Heineman i Hall, 2001)
<b>klaster kwaśnych aminokwasów</b>	gE VZV	pośredniczenie w transporcie glikoproteiny do części <i>trans</i> aparatu Golgiego	(Alconada i wsp., 1999)

Motyw dileucynowy (LL), którego funkcja i działanie są podobne jak w przypadku motywu tyrozynowego, pełni swoją rolę przez wiązanie sekwencji obejmującej reszty aminokwasowe leucyny do podjednostki  $\sigma$  białka adaptorowego z rodziny AP (Kelly i wsp., 2008).

Klaster kwaśnych aminokwasów, należący do rodziny motywów sygnałowych opartych o reszty aminokwasów kwaśnych, zawiera sekwencje konsensusowe dla fosforylacji przez komórkową kinazę 2 (CK2) i interakcji z białkiem PACS-1 (Crump i wsp., 2001).

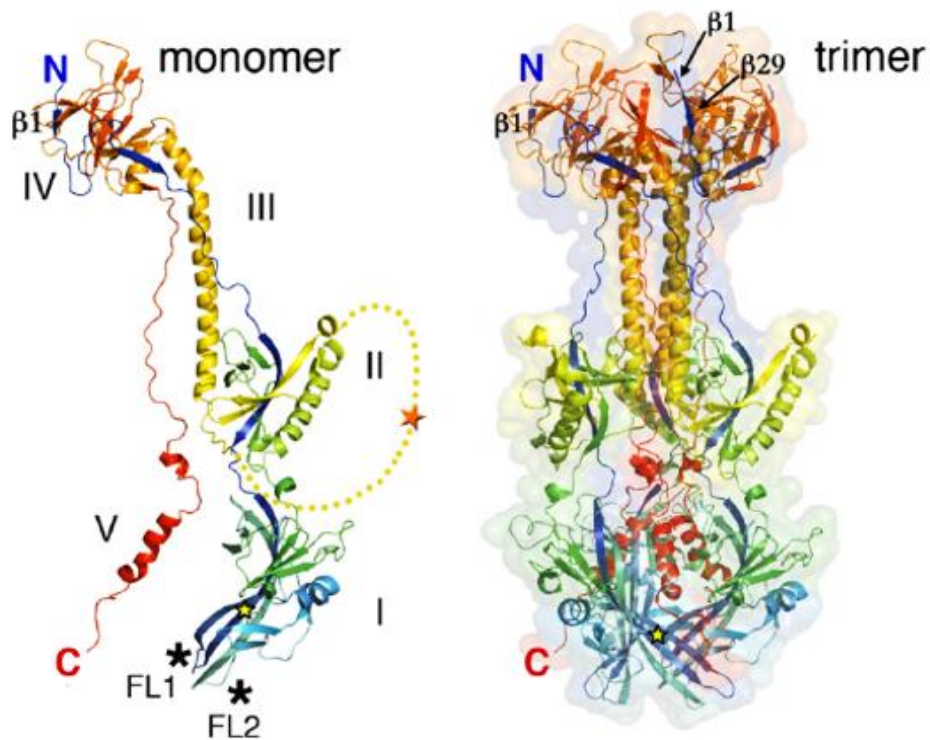
### *3.2.2 Glikoproteina B alfaherpeswirusów*

Gen **UL27** kodujący **glikoproteinę B** jest jednym z najsilniej konserwowanych genów wśród herpeswirusów a produkt jego transkrypcji i translacji należy do grupy białek obligatoryjnych. gB, poprzez wiązanie do reszt siarczanu heparanu na powierzchni komórki gospodarza i utworzenie kompleksu z heterodimerem gH/gL, warunkuje fuzję osłonki wirusa z błoną komórkową i uwolnienie kapsydu do wnętrza komórki.

#### *3.2.2.1 Struktura glikoproteiny B alfaherpeswirusów i funkcje na różnych etapach infekcji*

Transbłonowa glikoproteina B należy do grupy białek fuzyjnych klasy III, a jej organizacja cząsteczki złożona ze struktur  $\alpha$ - i  $\beta$ - drugorzędowych, łączy w sobie cechy charakterystyczne dla białek fuzyjnych klasy I i II (Backovic i Jardetzky, 2011). Poszczególne domeny gB są do siebie podobne i zawierają centralnie usytuowaną spiralę utworzoną z trzech nici łańcucha polipeptydowego, typową dla białek klasy I. Jednak w przeciwieństwie do białek klasy I, w których peptyd fuzyjny jest usytuowany na N-końcu, gB posiada wewnętrzną dwudzielną pętlę fuzyjne w domenie I, analogiczną do pojedynczej pętli fuzyjnej białka fuzyjnego klasy II. Pętla fuzyjna białek klasy II składa się w całości z aminokwasów hydrofobowych, podczas gdy pętla fuzyjna gB posiada zarówno aminokwasy hydrofobowe, jak i z polarnym łańcuchem bocznym, posiadające ładunek. W szczególności pętla fuzyjogenne odpowiadają domenom obejmującym reszty aminokwasowe 173-179 i 258-265 białka gB (Falanga i wsp., 2012).

W zależności od gatunku alfaherpeswirusa wielkość białka waha się od 903 do 947 reszt aminokwasowych. Składa się ono z trzech podjednostek (homotrimer), połączonych mostkami dwusiarczkowymi (**Rycina 6**). Forma prekursorowa białka w wyniku N- i O-glikozylacji, zachodzącej według różnych wzorów u poszczególnych przedstawicieli alfaherpeswirusów, jest przekształcana w podjednostkę gBa (Galdiero i wsp., 2008). Monomery gBb i gBc są wynikiem cięcia proteolitycznego gBa przez komórkową furynę (Hampl i wsp. 1984; Wölfer i wsp. 1990). Większość homologów gB ulega takiemu cięciu (wyjątkiem jest, np.: gB HSV-1 (Wenske i wsp., 1982) i pełni swoją funkcję jako trimer z uwzględnieniem jej konformacji pośrednich, m.in. przed i po fuzji, zależnych od zmian poziomu pH (Muggeridge, 2012).



**RYCINA 6. Struktura formy monomerycznej i trimera gB PRV otrzymana na podstawie badań krystalograficznych skróconej formy białka (59-756 aa).** Regiony tworzące pięć domen gB oznaczono cyframi rzymskimi od I do V. Pętle fuzyjne (FL1 i FL2) zlokalizowane są w obrębie domeny I. Sekwencja łącząca domeny II i III, która nie została określona w tym modelu, jest zaznaczona jako żółta przerywana linia, aby wskazać przypuszczalne położenie miejsca cięcia furyną (pomarańczowa gwiazda). Miejsce glikozylacji asparaginy 264, do którego przyłączona jest pojedyncza reszta N-acetyloglukozaminy, reprezentuje żółta gwiazda. (na podstawie Vallbracht i wsp., 2017, zmienione).

Glikoproteina B jest białkiem niezbędnym w cyklu rozwojowym alfaherpeswirusów. gB wirusa HSV-1 przypisuje się funkcję w fuzji pomiędzy osłonką wirionu i zewnętrzną błoną jądrową podczas transportu niedojrzałej cząstki wirusowej. gB wirusa HSV-1 pełni również rolę, wraz z gK, w indukowanej przez wirusy fuzji komórkowej (tworzenie syncytiów) (Chouljenko i wsp., 2009). W przypadku wirusa PRV wykazano również udział w rozprzestrzenianiu się wirusa drogą bezpośredniej transmisji z komórki do komórki (Rauh i Mettenleiter 1991).

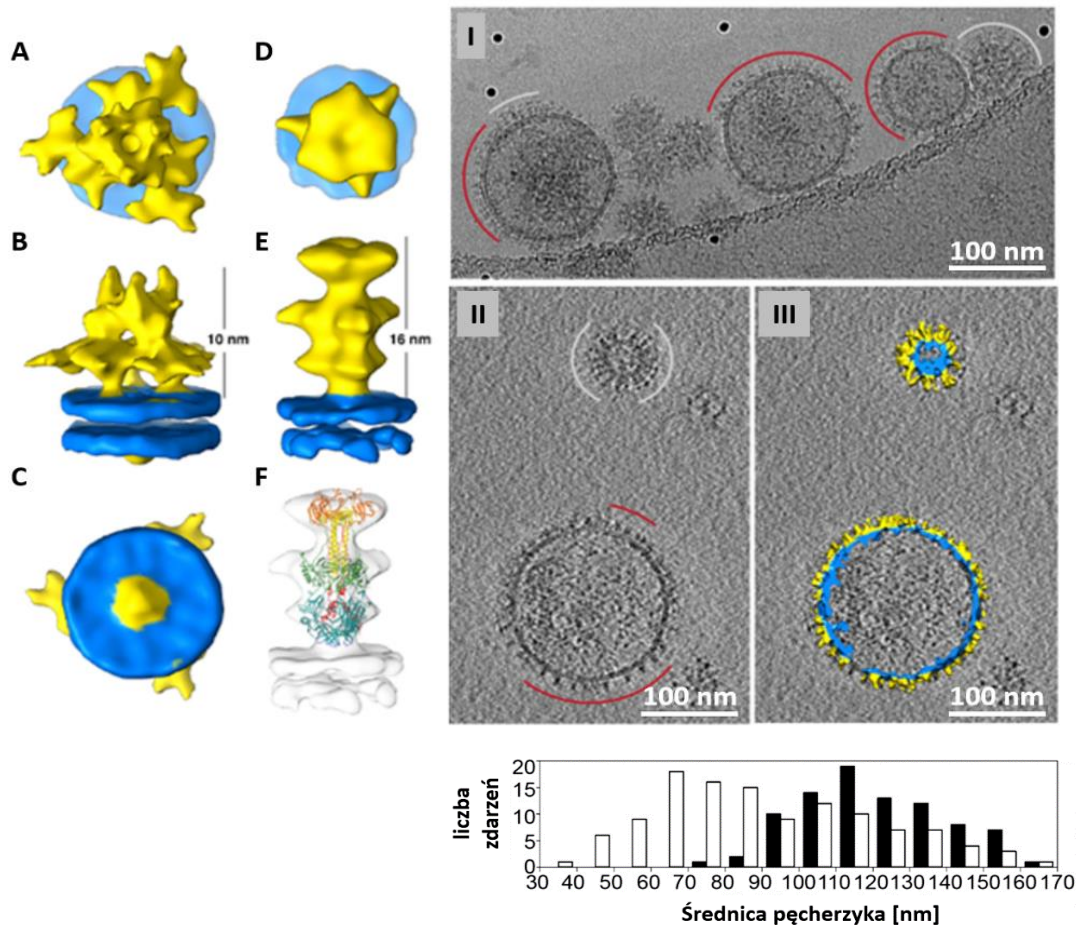
### *3.2.2.2 Właściwości immunomodulacyjne glikoproteiny B alfaherpeswirusów poprzez interakcje z cząsteczkami MHC klasy II*

Chociaż to cząsteczki MHC klasy I są głównym celem herpeswirusowych mechanizmów unikania odpowiedzi immunologicznej, odnotowano wśród ich przedstawicieli przykłady ingerowania w szlak prezentacji antygenów głównego układu zgodności tkankowej klasy II.

gB HSV-1 posiada w swojej sekwencji aminokwasowej fragment identyczny ze znajdującym się w białku CD74/li – łańcuchu niezmiennym związanym z cząsteczkami MHC klasy II. Sąsiaduje on z wysoce konserwowanym motywem wiążącym cząsteczki HLA-DR1. Oba te segmenty sekwencji wirusowej przypominają miejsce wiązania MHC klasy II i ludzkiego CD74/li (Sievers i wsp., 2002). Co więcej, gB HSV-1 moduluje prezentację antygeny poprzez indukowanie fuzji wczesnych endosomów i zatrzymywanie w zmienionych w ten sposób strukturach cząsteczek MHC II. Model komórkowy z konstytutywną ekspresją genu gB uwidacznia olbrzymie pęcherzyki pochodzenia endosomalnego, zawierające duże ilości cząsteczek MHC II i markerów wczesnych endosomów (EEA1, Rab5), oddziałujących z gB. Podobny efekt był widoczny w liniach komórkowych infekowanych wirusem HSV-1 (Niazy w wsp., 2017). Dalsze badania wykazały udział gB w kierowaniu cząsteczek HLA-DR do egzosomów i zwiększenie ilości wydzielanego na szlaku egzosomalnym białka CD63, potwierdzając immunomodulacyjną funkcję gB (Temme i wsp., 2010). Doniesienia te, korespondują z wcześniejszymi badaniami, w których obserwowano, iż funkcjonalne MVBs pełnią istotną funkcję w transporcie i dojrzewaniu gB HSV-1 oraz powstawaniu dojrzałych wirionów (Calistri i wsp., 2007).

Badanie z wykorzystaniem tomografii krioelektronowej dla analizy pęcherzyków

zewnątrzkomórkowych izolowanych z komórek transfekowanych konstruktem niosącym pełnej długości gen gB HSV-1, potwierdziło obecność gB zakotwiczonej w błonie EVs i pozwoliło na dokładniejsze określenie struktury tego białka w znanej formie trimerycznej post-fuzyjnej oraz wykazanie nowej – krótszej i bardziej skondensowanej (**Rycina 7**) (Zeev-Ben-Mordehai i wsp., 2016).



**RYCINA 7. Struktura i obraz uzyskany za pomocą tomografii krioelektronowej dwóch różnych trimerycznych konformacji pełnej długości gB HSV-1 zakotwiczonej w błonie pęcherzyka zewnątrzkomórkowego.** Widok ortogonalny trimerycznych form gB: błona – kolor niebieski, gB – kolor żółty; A-C reprezentacja izopowierzchni po rekonstrukcji 3D postaci długiej gB, D-E reprezentacja izopowierzchni po rekonstrukcji 3D postaci krótkiej gB, F – trójwymiarowa rekonstrukcja formy długiej (jak w E, zabarwiona na biało) z dopasowaną strukturą krystaliczną po fuzji. Obraz tomografii krioelektronowej gB HSV-1 zakotwiczonej w błonie pęcherzyka zewnątrzkomórkowego: I, II – czerwone łuki oznaczają krótką formę gB, a białe – długą formę gB, III – trójwymiarowe odwzorowanie tomogramu przedstawionego w II, błona – kolor niebieski, gB – kolor żółty; wykres przedstawiający dystrybucję pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z wykazaniem formy długiej (białe słupki) oraz krótkiej (czarne słupki) (na podstawie Zeev-Ben-Mordehai i wsp., 2016, zmienione).



## 4 CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było zbadanie związku glikoproteiny B trzech wybranych alfaherpeswirusów (HSV-1, BoHV-1, PRV) ze szlakiem endosomalno-egzosomalnym komórek, poprzez:

- badanie zdolności gB do lokalizacji w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wraz z próbą określenia mechanizmu inkorporacji gB do EVs,
- badanie zdolności gB do oddziaływania z cząsteczkami MHC klasy II (ludzkimi i bydłęcymi) i obniżania poziomu MHC II na powierzchni komórek, co świadczyłoby o immunomodulacyjnej funkcji gB.

Aby dokonać oceny czy inkorporacja gB do EVs oraz jej interakcje z MHC II są właściwościami konserwowanymi ewolucyjnie, trzy homologi gB analizowano porównawczo. gB wirusa HSV-1 wybrano jako odnośnik, ponieważ jej aktywność w kontekście EVs i MHC II została wcześniej opisana w literaturze; gB wirusów BoHV-1 i PRV nie zostały wcześniej poddane podobnym testom. Wyniki mogłyby pozwolić na bardziej dokładne poznanie interakcji molekularnych pomiędzy herpeswirusami a komórką gospodarza przez obserwację mechanizmu działania najbardziej konserwowanego w rodzinie herpeswirusów białka osłonkowego – gB.

Dodatkowo, celem pracy była również charakterystyka fizyko- biochemiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez komórki infekowane wybranymi alfaherpeswirusami, mogąca dostarczyć nowych informacji o potencjalnej roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych podczas infekcji herpeswirusowej.

Wykonane w ramach pracy doktorskiej badania były częścią projektu zatytułowanego „Badanie roli egzosomów w przebiegu infekcji alfaherpeswirusami”, finansowanego z programu SONATA Narodowego Centrum Nauki.

## 5 MATERIAŁY

### 5.1 Szczepy bakteryjne

***Escherichia coli* - Top10** – *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 *deoR recA1 ara*  $\Delta$ 139  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *galU galK* *l*<sup>-</sup> *rpsL*(*str*<sup>R</sup>) *endA1 nupG* – szczep bakteryjny używany do namnożenia plazmidów (Thermo Scientific/Invitrogen, USA).

### 5.2 Szczepy wirusowe

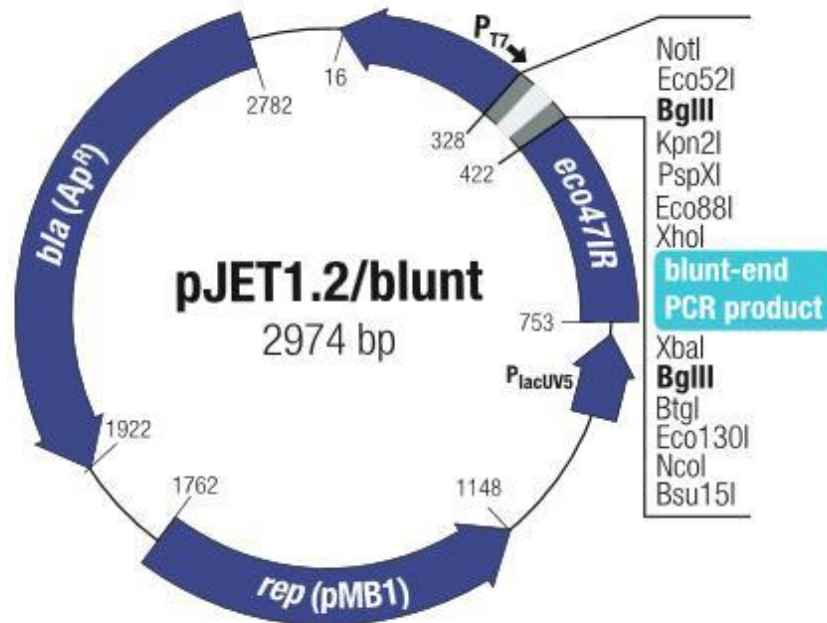
**HSV-1** Ludzki herpeswirus 1, szczep syn 17+ - izolat kliniczny otrzymany z Friedrich Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health (Niemcy), namnażany i miareczkowany przy użyciu ssaczej linii komórkowej Vero.

**BHV-1** Bydlęcy herpeswirus 1, podtyp 1, szczep Lam - izolat kliniczny otrzymany z Institute for Animal Health and Science (Holandia), namnażany i miareczkowany przy użyciu ssaczej linii komórkowej MDBK.

**PRV** Wirus pseudowścieklizny, szczep NIA-3 – izolat kliniczny otrzymany z Institute for Animal Health and Science (Holandia), namnażany i miareczkowany przy użyciu ssaczej linii komórkowej SK6.

### 5.3 Wektory plazmidowe

**pJET1.2** – wektor liniowy przeznaczony do klonowania i analizy produktów PCR (**Rycina 8**) (Thermo Scientific, USA).



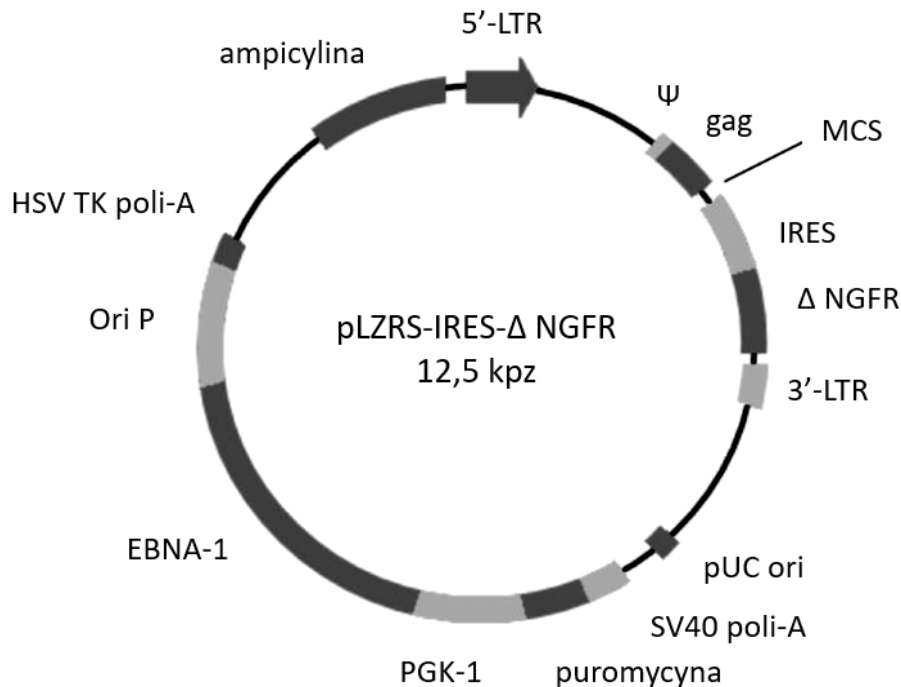
RYCINA 8. Mapa plazmidu pJET1.2

(źródło: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231#/K1231>).

**pLZRS-IRES-ΔNGFR** – wektor retrowirusowy, którego konstrukcja została oparta na wirusie mysiej białaczki Moloney’a (MMLV) (**Rycina 9**); w swojej sekwencji zawiera:

- element *pUC-ori* pozwalający na replikację plazmidu w systemach bakteryjnych, a także *oriP* oraz *EBNA-1* wirusa Epstein-Barr (EBV), umożliwiające namnażanie wektora w komórkach eukariotycznych,
- sygnał pakowania RNA ( $\Psi$ ) wraz z fragmentami 3’LTR i 5’LTR biorącymi udział w integracji fragmentu wektora do DNA komórek ssaczych,
- promotor retrowirusowy w obrębie 5’LTR, warunkujący ekspresję genu umieszczonego w MCS (ang. *multiple cloning site*),
- geny oporności na ampicylinę i puromycynę,
- sekwencję IRES odpowiedzialną za translację białka reporterowego – skróconej, przez delecję sekwencji kodującej domenę cytoplazmatyczną, formy receptora nerwowego czynnika wzrostu NGFR (ang. *nerve growth factor receptor*)

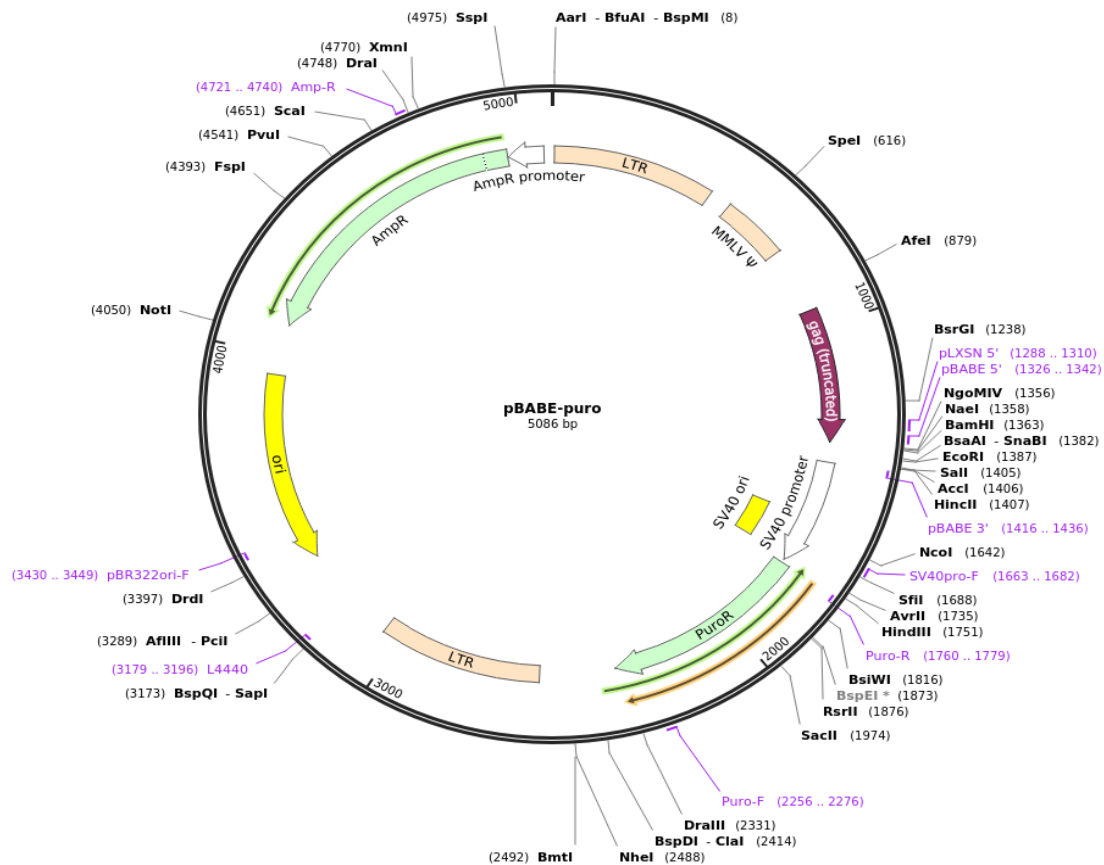
(Zbiory Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów, MWB UG-GUMed, Polska, pierwotne źródło – Stanford University, USA [https://web.stanford.edu/group/nolan/OldWebsite/retroviral systems/retsys.html](https://web.stanford.edu/group/nolan/OldWebsite/retroviral%20systems/retsys.html)).



**RYCINA 9.** Mapa plazmidu pLZRS-IRES-Δ NGFR (źródło: Zbiory Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów, MWB UG-GUMed, Polska, pierwotne źródło – Stanford University, USA).

**pCMV-VSV-G** – plazmid zawierający gen glikoproteiny G wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej VSV (ang. *vesicular stomatitis virus*) pod kontrolą promotora P<sub>hCMV</sub> (Cell Biolabs, USA).

**pBABEpuro** – wektor retrowirusowy, którego konstrukcja została oparta na wirusie mysiej białaczkę Moloney'ego (MMLV) (Morgenstern i Land, 1990) (**Rycina 10**); w swojej sekwencji zawiera pUC-ori, sygnał pakowania (Ψ), fragmenty 3'LTR i 5'LTR (z promotorem retrowirusowym), gen oporności na puromycynę (Zbiory Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów, MWB UG-GUMed, Polska, pierwotne źródło – Stanford University, USA [https://web.stanford.edu/group/nolan/OldWebsite/retroviral systems/retsys.html](https://web.stanford.edu/group/nolan/OldWebsite/retroviral%20systems/retsys.html)).



RYCINA 10. Mapa plazmidu pBABE-puro (źródło: <https://www.addgene.org/1764/>).

**pFB-CMV-VSVG-gB** – plazmid zawierający sekwencję kodującą glikoproteinę B wirusa PRV, wykorzystany do uzyskania na drodze klonowania molekularnego plazmidu na bazie wektora retrowirusowego z sekwencją genu glikoproteiny B wirusa PRV (Zbiory Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów, MWB UG-GUMed, Polska/ Grabowska i wsp., 2009).

#### 5.4 Sekwencje nukleotydowe genów wirusowych

	NCBI ID
<b>HSV-1 gB</b>	24271469
<b>BoHV-1 gB</b>	JX898220 region: 55564–58365
<b>PRV gB</b>	2952558

## 5.5 Linie komórkowe

**MelJuSo (MJS)** (University Medical Center Utrecht, Holandia) linia ciągła komórek ludzkiego czerniaka, hodowana w pożywce RPMI-1640.

**MelJuSo (MJS) gD BoHV-1** (linia komórkowa skonstruowana przez dr Małgorzatę Graul w ramach jej pracy doktorskiej, Zakład Biologii Molekularnej Wirusów, MWB G-GUMed, Polska/ M. Graul *Modulacja odpowiedzi immunologicznej podczas infekcji herpeswirusem - molekularne aspekty działania kompleksu białek UL49.5/gM wirusa BHV-1*) linia ciągła komórek ludzkiego czerniaka z konstytutywną ekspresją genu glikoproteiny D bydlęcego herpeswirusa 1, hodowana w pożywce RPMI-1640.

**Jurkat** (E6.1, ECACC, Wielka Brytania) linia ciągła ludzkich limfocytów T w stadium ostrej białaczki hodowana w pożywce RPMI-1640; w celu zwiększenia produkcji gB aktywowana w trakcie hodowli dodatkiem 100 nM 13-octanu 12-mirystynianu forbolu (PMA) i 1 mg/ml fitohemaglutyniny (PHA).

**MDBK** (ang. *Madin–Darby bovine kidney*) (CCL-22, ATCC, USA) linia ciągła komórek embrionalnych pochodzących z nerki bydlęcej, hodowana w pożywce RPMI-1640.

**SK6** (ang. *swine kidney*, klon 6) (Institute for Animal Health and Science, Holandia) linia ciągła spontanicznie immortalizowanych komórek nerki świńskiej, hodowana w pożywce DMEM.

**Huh-7** (University of Glasgow, UK) linia ciągła komórek ludzkich izolowanych z guza nowotworowego wątroby, hodowana w pożywce DMEM.

**Vero** (CCL-81, ATCC, USA) linia ciągła komórek pochodzących z nerki kotawca jasnonogiego (ang. *African green monkey*) hodowana w pożywce DMEM.

**GP2–293** (Takara/Clontech, Japonia) linia pakująca systemu retrowirusowego, będąca pochodną linii HEK 293T (linia komórkowa ludzkiej nerki transformowana adenowirusem i transfekowana plazmidem umożliwiającym ekspresję genu dużego antygeny T wirusa SV40), wykorzystywana do uzyskania cząstek retrowirusowych, hodowana w pożywce IMDM.

## 5.6 Media hodowlane komórek bakteryjnych i ssaczych

**LB** (Luria-Broth) bakteryjne płynne podłoże hodowlane [zawierające w składzie na 200ml: 2g bacto tryptonu, 1g ekstraktu drożdżowego, 2g NaCl o ustalonym pH=7,0 i autoklawowane przez 30 min przy 0,7 atm]

**LA** (Luria Agar) bakteryjne stałe podłoże hodowlane [zawierające w składzie na 200ml: 3g bacto agaru, 2g bacto tryptonu, 1g ekstraktu drożdżowego, 2g NaCl o ustalonym pH=7,0 i autoklawowane przez 30 min przy 0,7 atm]

**RPMI- 1640** (Sigma, USA) podłoże wzrostowe stosowane do hodowli komórek ssaczych, suplementowane L-glutaminą i roztworem antybiotyków (zgodnie z zaleceniami producenta) oraz inaktywowaną surowicą bydlęcą do stężenia końcowego 10% (Sigma, USA)

**DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)** (Corning, USA) podłoże wzrostowe stosowane do hodowli komórek ssaczych, suplementowane L-glutaminą i roztworem antybiotyków (zgodnie z zaleceniami producenta) oraz inaktywowaną surowicą bydlęcą do stężenia końcowego 8% lub 20% (Corning, USA)

**IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)** (Lonza, Switzerland) podłoże wzrostowe stosowane do hodowli komórek ssaczych, suplementowane L-glutaminą i roztworem antybiotyków (zgodnie z zaleceniami producenta) oraz inaktywowaną surowicą bydlęcą do stężenia końcowego 10%

**Hybridomed DIF-1000** (Biochrom, Germany) podłoże wzrostowe stosowane do hodowli komórek ssaczych – przeznaczonych do izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, suplementowane L-glutaminą i roztworem antybiotyków (zgodnie z zaleceniami producenta), pozbawione dodatku inaktywowanej surowicy bydlęcej ze względu na możliwość wprowadzenia do układu struktur

## 5.7 Przeciwciała i znaczniki fluorescencyjne

<i>lp.</i>	<i>nazwa przeciwciała</i>	<i>stosowane rozcieńczenie</i> <i>WB – Western Blotting</i> <i>IF – Immunofluorescencja</i> <i>FC – Cytometria przepływowa</i> <i>IP – Immunoprecypitacja</i>	<i>producent</i>
<b>przeciwciała pierwszorzędowe</b>			
1	Mysie przeciwciało monoklonale anty- <i>HSV-1/2 gB (10B7)</i>	WB: 1:2000 IF: 1:1000 FC: 1:1000 IP: 1u	Santa Cruz Biotechnology, USA
2	Mysie przeciwciało monoklonale anty- <i>BoHV-1 gB (H2)</i>	WB: 1:2000 IF: 1:1000 FC: 1:1000 IP: 1u	VMRD, USA
3	Kozia surowica poliklonalna anty- <i>IBR/BoHV-1</i>	WB: 1:2000 IF: 1:1000 FC: 1:1000	VMRD, USA
4	Królicza poliklonalna surowica PRV <i>gB-specyficzna</i>	WB: 1:2000 IF: 1:1000 FC: 1:1000	udostępnione przez Hanns-Joachim Rziha (Friedrich Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Niemcy)
5	Mysie przeciwciało monoklonale anty- <i>PRV gB (A20-c26)</i>	WB: 1:2000 IF: 1:1000 FC: 1:1000	udostępnione przez Hanns-Joachim Rziha (Friedrich Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Niemcy)
6	Mysie przeciwciało monoklonale anty- <i>Alix (3A9)</i>	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
7	Mysie przeciwciało monoklonale anty- <i>CD63 (MX-49.129.5)</i>	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA



8	Kozie przeciwciało poliklonalne anty-CD63	IF: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
9	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-CD9 (MCA-469GA)	WB: 1:1000	Bio-Rad/AbD Serotec, USA
10	Królicze przeciwciało monoklonalne anty-flotyllina-2	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
11	Kozie przeciwciało poliklonalne anty-kalneksyna	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
12	Królicze przeciwciało poliklonalne anty-Tom40	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
13	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-HLA-DR (L243)	WB: 1:2000 IF: 1:1000 FC: 1:1000 IP: 1u	Santa Cruz Biotechnology, USA
14	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-bydłęce MHC II (IL-A21)	WB: 1:2000 IF: 1:1000 FC: 1:1000 IP: 1u	zebrane jako hybrydoma supernatantu znad hodowli komórkowej Merck/Sigma, USA
15	Królicze przeciwciało poliklonalne anty-HLA-DR $\alpha$	WB: 1:2000 IF: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
16	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-HLA-DR $\alpha$ (G-7)	WB: 1:2000 IF: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
17	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-HLA-DR $\beta$ (TAL14.1)	WB: 1:2000 IF: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
18	Królicze przeciwciało poliklonalne anty-HLA-DR $\beta$	WB: 1:2000 IF: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
19	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-HSV-1/2 gC (3G9)	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
20	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-HSV-1/2 gD (DL6)	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
21	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-HSV-1/2 ICP5 (3B6)	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
22	Królicze przeciwciało poliklonalne anty-HSV-1 $\gamma$ 34.5/ ICP34.5	WB: 1:1000	Bioss Antibodies, USA

23	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-BoHV-1 gC (F2)	WB: 1:1000	VMRD, USA
24	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-BoHV-1 gD	WB: 1:1000	VMRD, USA
25	Królicza surowica specyficzna BoHV-1 VP5-	WB: 1:1000	udostępnione przez Sylvia van Drunen Littel-van den Hurk (University of Saskatchewan, Kanada)
26	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-BoHV-1 gE	WB: 1:1000	udostępnione przez Frans Rijsewijk (Institute for Animal Health and Science, Holandia)
27	Królicze przeciwciało poliklonalne anty- BoHV-1 gM	WB: 1:600	Zbiory Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów (MWB UG-GUMed, Polska)
28	Królicze przeciwciało poliklonalne anty- BoHV-1 UL49.5 (H11)	WB: 1:600	Zbiory Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów (MWB UG-GUMed, Polska)
29	Mysie przeciwciało anty- PRV gC (B16-d6)	WB: 1:1000	udostępnione przez Hanns-Joachim Rziha (Friedrich Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Niemcy)
30	Królicze przeciwciało poliklonalne anty-PRV gD (016/00)	WB: 1:1000	udostępnione przez Hanns-Joachim Rziha (Friedrich Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Niemcy)
31	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-PRV gE	WB: 1:1000	udostępnione przez Hanns-Joachim Rziha (Friedrich Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Niemcy)
32	Królicze przeciwciało monoklonalne anty- EEA1	IF: 1:300	Endosomal Marker Antibody Sampler Kit (Cell Signaling Technology, USA)
33	Królicze przeciwciało monoklonalne anty- Rab11	IF: 1:300	
34	Królicze przeciwciało monoklonalne anty-Rab7	IF: 1:300	
35	Królicze przeciwciało monoklonalne anty- LAMP1	IF: 1:300	
36	Mysie przeciwciało monoklonalne anty-NGFR	FC: 1:100	Merck/Sigma, USA

### **przeciwciała drugorzędowe**

37	koniugat przeciwciał chrzanową	kozich IgG z	anty-mysich peroksydazą	WB: 1:2000	Jackson, Immuno-Research, USA
38	koniugat przeciwciał chrzanową	oślich IgG z	anty-króliczych peroksydazą	WB: 1:2000	Jackson, Immuno-Research, USA
39	koniugat przeciwciał chrzanową	oślich IgG z	anty-kozich peroksydazą	WB: 1:2000	Jackson, Immuno-Research, USA
40	koniugat przeciwciał IgG z fikoerytryną	kozich	anty-mysich	FC: 1:350	Becton Dickinson, USA
41	koniugat przeciwciał lekki IgG z peroksydazą chrzanową	kozich rozpoznających łańcuch	anty-mysich	WB: 1:5000	Jackson, Immuno-Research, USA
42	koniugat przeciwciał Alexa Fluor 546	kozich	anty-mysich IgG z	IF: 1:1000	Thermo Scientific, USA
43	koniugat przeciwciał z Alexa Fluor 488	kozich	anty-króliczych IgG	IF: 1:1000	Thermo Scientific, USA
44	koniugat przeciwciał Alexa Fluor 488	oślich	anty-kozich IgG z	IF: 1:1000	Thermo Scientific, USA
45	koniugat przeciwciał z Alexa Fluor 633	kozich	anty-króliczych IgG	IF: 1:1000	Thermo Scientific, USA

### **znaczniki fluorescencyjne**

<b>lp.</b>	<b>nazwa znacznika fluorescencyjnego</b>	<b>opis</b>	<b>producent</b>
1	PKH67 Green Cell Linker	Zestaw do ogólnego znakowania błony komórkowej znacznikiem zielonej fluorescencji o wartości ekstynkcji 490 nm i emisji 502 nm	Merck/Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy
2	LysoTracker DND-99	Barwnik czerwonej fluorescencji (ekstynkcja 577 nm/ emisja 590 nm) do znakowania i śledzenia organelli (o kwaśnym odczynie pH) w żywych komórkach	Invitrogen, USA

## 5.8 Startery

<i>Nazwa kasety</i>		<i>Sekwencja nukleotydowa (5'-3')</i>
<b><i>gB HSV-1</i></b> <b><i>FW</i></b>		CGGGATCCGCCATGCGCCAGGGC
	<b><i>REV</i></b>	GGAATTCACAGGTCGTCCTCGTCGGCG
<b><i>gB BoHV-1</i></b> <b><i>FW</i></b>	<b><i>1</i></b>	CCGTCTTTGCGTCCGTCTTCCAC
	<b><i>2 REV</i></b>	CGCCGCGGCGGCGAACAG
	<b><i>3 FW</i></b>	CTGGCGCGCTCGAACGGCAC
	<b><i>4 REV</i></b>	GCGCACGTCCCGCCTCCAAG
	<b><i>BamHI/FW</i></b>	CGGGATCCACCATGGCCGCTCGC
<b><i>EcoRI Rev</i></b>	GGAATTCTCATGCCCGGACGTC	

## 5.9 Wzorce masowe

**Wzorzec masowy do elektroforezy agarozowej DNA – Gene Ruler DNA Ladder Mix** – fragmenty DNA o wielkości par zasad: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 (Thermo Scientific, USA)

**Wzorzec masowy do elektroforezy poliakryloamidowej białek – PageRuler Prestained Protein Ladder** – barwny wzorzec białek o wielkości 170, 130, 95, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 kDa (Thermo Scientific, USA)

**Wzorzec masowy do elektroforezy poliakryloamidowej białek – PageRuler Plus Prestained Protein Ladder** – barwny wzorzec białek o wielkości 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 kDa (Thermo Scientific, USA)

## 5.10 Enzymy

**Antarktyczna fosfataza** enzym defosforylujący końce 5' fragmentu DNA (New England BioLabs, USA)

**Bufor do antarktycznej fosfatazy 10x stężony** (New England BioLabs, USA)

**Bufor do ligazy DNA faga T4 10x stężony** (Thermo Scientific, USA)

**Bufor *EcoRI* 10x stężony** (Thermo Scientific, USA)

**Bufor FastDigest 10x stężony** (Thermo Scientific, USA)

**Bufor G5** (New England BioLabs, USA)

**Bufor G7** (New England BioLabs, USA)

**Bufor NP-40** (New England BioLabs, USA)

**Bufor Red 10x stężony** (Thermo Scientific, USA)

**Bufor Tango 10x stężony** (Thermo Scientific, USA)

**Endoglikozydaza H (EndoH)** (New England BioLabs, USA)

**Enzym *BamHI*** (Thermo Scientific, USA)

**Enzym *EcoRI*** (Thermo Scientific, USA)

**Enzym *HindIII*** (Thermo Scientific, USA)

**Enzym *XhoI*** (Thermo Scientific, USA)

**FastDigest *BamHI*** (Thermo Scientific, USA)

**FastDigest *EcoRI*** (Thermo Scientific, USA)

**FastDigest *HindIII*** (Thermo Scientific, USA)

**FastDigest *XhoI*** (Thermo Scientific, USA)

**Ligaza DNA faga T4** (Thermo Scientific, USA)

**Peptydylo-N-glikozydaza F (PNGaza F)** (New England BioLabs, USA)

**Polimeraza WALK enzym reakcji PCR** (A&A Biotechnology, Polska)

## 5.11 Bufory i inne odczynniki

**0,25 M sacharoza** (CHEMPUR, Polska)

**0,25% Trypsyna-EDTA** (Thermo Scientific, USA)

**0,32% cytrynian trisodowy w PBS**

**0,4% w/v błękit trypanu w PBS** (Sigma, USA)

**0,5 M roztwór wodny EDTA** pH=8,0 [na 1 l roztworu: 186,1 g EDTA, 20,0 g NaOH]

**0,5 mg/ml roztwór wodny polibrenu** (Sigma-Aldrich, USA)

**0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** (POCh, Polska)

**1 M Tris HCl** pH=6,8 (Sigma, USA)

**1 mg/ml fitohemaglutynina (PHA)** (Merck/Sigma, USA)

**1 mg/ml roztwór wodny puromycyny** (dodawany do pożywki do stężenia 2/4 µg/ml)

(MP Biochemicals, USA)

**1% metyloceluloza w pożywce DMEM** [6,25% FBS, 0,2% NaHCO<sub>4</sub>, 4,2 mM L-glutamina, 0,7x stężony roztwór antybiotyków]

**1% fiolet krystaliczny** (Park Scientific, UK)

**1,5 M Tris HCl** pH=8,8 (Sigma, USA)

**10% roztwór wodny nadsiarczanu amonu (APS)** (Merck/Sigma, USA)

**10% roztwór wodny siarczanu dodecylu sodu (SDS)** (Merck/Sigma, USA)

**100 mM roztwór wodny MgCl<sub>2</sub>**

**100 mM roztwór wodny MgCl<sub>2</sub> + 5% glicerol**

**100 nM 13-octanu 12-mirystynianu forbolu (PMA)** (Merck/Sigma, USA)

**100% metanol (MetOH)** (POCh, Polska)

**10x stężony roztwór antybiotyków (AA)** penicylina G 10000 u/ml, streptomycyna 10000 µg/ml, amfoterycyna B 25 µg/ml w 0,85% NaCl (Merck/Sigma USA)

**2% roztwór octanu uranylu (POCh, Polska)**

**2,5% i 5% roztwór mleka odtłuszczonego w TBST**

**200 mg/ml roztwór wodny ampicyliny** dodawany do pożywki do stężenia końcowego 100  $\mu$ l/ml (Polfa, Polska)

**200 mM L-glutamina (Merck/Sigma, USA)**

**2x stężony bufor HBS** [140 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 50 mM HEPES, pH=7,05]

**HEPES (Merck/Sigma, USA)**

**3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna (TMB) (Merck/Sigma, USA)**

**30% roztwór wodny akryloamidów** [29,2% akryloamid, 0,8% N, N'-metyleno-bisakryloamid] (Merck/Sigma, USA)

**37% kwas solny (HCl) (POCh, Polska)**

**4% paraformaldehyd w PBS (Sigma, USA)**

**5 M roztwór wodny betainy (Merck/Sigma, USA)**

**50x stężony roztwór wodny jodoacetamidu (IAA) (Sigma, USA)**

**99,8% etanol bezwodny (EtOH) (POCh, Polska)**

**Agaroz (Merck/Sigma, USA)**

**Albumina bydlęca (BSA) (Merck/Sigma, USA)**

**Azydek sodu (NaN<sub>3</sub>) (Sigma, USA)**

**Bacto agar (Difco, USA)**

**Bacto trypton (Difco, USA)**

**BCA Protein Assay (Santa Cruz Biotechnology, USA)**

**Błękit bromofenolowy (Merck/Sigma, USA)**

**Bufor do transferu półsuchego** [na 250 ml buforu: 0,7325 g glicyna, 1,4525 g tris, 0,09375 g SDS, 50 ml MetOH]

**Bufor elektrodowy do elektroforezy poliakryloamidowej białek w warunkach denaturujących 1x stężony** pH=8,3 [na 1 l buforu: 3,02 g Tris, 14,42 g glicyna, 1,00 g SDS]

**Bufor lizująco-obciążający do elektroforezy poliakryloamidowej białek w warunkach denaturujących 4x stężony** [0,25 M Tris HCl pH=6,8, 8% SDS, 40% glicerol, 20% β-merkaptioetanol, 0,04% błękit bromofenolowy]

**Bufor lizująco-obciążający do elektroforezy poliakryloamidowej białek w warunkach niedenaturujących 4x stężony** [0,25 M Tris HCl pH=6,8, 8% SDS, 40% glicerol, 0,04% błękit bromofenolowy]

**Bufor lizująco-obciążający do elektroforezy poliakryloamidowej białek w warunkach denaturujących 6x stężony** [0.375 M Tris pH=6,8%, 12% SDS, 60% glicerol, 20% β-merkaptioetanol, 0.06% błękit bromofenolowy]

**Bufor lizująco-obciążający do elektroforezy poliakryloamidowej białek w warunkach niedenaturujących 6x stężony** [0.375 M Tris pH=6,8%, 12% SDS, 60% glicerol, 0,06% błękit bromofenolowy]

**Bufor NET** [50 mM Tris pH=7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% Nonidet P40]

**Bufor obciążający do elektroforezy agarozowej 6x stężony** (Thermo Scientific, USA)

**Bufor PBS 1x stężony** [na 1 l buforu: 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,00 g NaCl, 0,20 g KCl]

**Bufor PBST** PBS 1x stężony + 1% Tween20

**Bufor RIPA** [150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,1% SDS, 5 mM EDTA, 0,5% kwas dezoksycholowy]

**Bufor TAE 1x stężony** [40 mM Tris, 20 mM kwas octowy, 1mM EDTA]

**Bufor TBS** [50mM Tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl]

**Bufor TBST 1x stężony** TBS + 0,1% Tween20

**Bufor TE** [10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH=8,0]

**Bufor TritonX-100 w PBS (TPBS)** PBS 1x stężony + 0,1% TritonX-100



**Bydlęca surowica płodowa (FBS)** termicznie inaktywowana (Merck/Sigma, USA)

**Chlorek magnezu (MgCl<sub>2</sub>)** (Merck/Sigma, USA)

**Chlorek potasu (KCl)** (POCh, Polska)

**Chlorek sodu (NaCl)** (Merck/Sigma, USA)

**Cytrynian trisodowy (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)** (POCh, Polska)

**Dejonizowana i autoklawowana woda (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>)** (system firmy Merck, Niemcy)

**Dodecylo siarczan sodu (SDS)** (Merck/Sigma, USA)

**D-PBS** (Merck/Sigma, USA)

**EDTA** (Serva, Niemcy)

**Ekstrakt drożdżowy** (Difco, USA)

**Fosforan monopotasowy (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)** (Merck/Sigma, USA)

**Glicerol** (POCh, Polska)

**Glicyna** (Merck/Sigma, USA)

**Izopropanol** (POCh, Polska)

**Jodiksanol (OptiPrep™)** (Merck/Sigma, USA)

**Kwas dezoksyholowy** (Sigma, USA)

**Metyloceluloza** (Sigma-Aldrich, USA)

**Mleko odtłuszczone** (SN Gostyń, Polska)

**N, N, N', N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED)** (Carl Roth GmbH, Niemcy)

**Nonidet P40 (NP-40)** (Sigma Aldrich, USA)

**Paraformaldehyd** (POCh, Polska)

**ProLong Diamond Antifade Mountant** odczynnik do przedłużania trwałości preparatów mikroskopowych (Life Technologies/Thermo Scientific, USA)

**Roztwór inhibitorów proteaz** (roztwór 100x stężony – cOmplete mini protease inhibitor cocktail) (Roche, Szwajcaria)

**Roztwór lizujący NP-40** [na 1l roztworu: 30 ml 5M NaCl, 100 ml 10% NP-40, 50 ml 1 M Tris pH=8,8, 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>]

**Roztwór PBA** 1% BSA w PBS z 0,02% NaN<sub>3</sub>

**Simply Safe™** znacznik fluorescencyjny kwasów nukleinowych dodawany w ilości 5 μl na 100ml 1% roztworu agarozy (EURx, Polska)

**Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate** (Thermo Scientific, USA)

**Tris** (Merck/Sigma, USA)

**TritonX-100** (Merck/Sigma, USA)

**Tween20** (POCh, Polska)

**Woda wolna od nukleaz** (Merck/Sigma, USA)

**Wodorofosforan sodu (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)** (POCh, Polska)

**Wodorotlenek sodu (NaOH)** (POCh, Polska)

**Zestaw DNA Gel-Out** (A&A, Biotechnology, Polska)

**Zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych Clean-Up** (A&A, Biotechnology, Polska)

**Zestaw Plasmid Midi AX** (A&A, Biotechnology, Polska)

**Zestaw Plasmid Mini** (A&A, Biotechnology, Polska)

**Zestaw Virus mini AX Transfect** (A&A, Biotechnology, Polska)

**Złoże do immunoprecypitacji Sepharose-Protein A** (GE Healthcare, Szwecja)

**Złoże Sepharose -CL-4B** (GE Healthcare, USA)

**β-merkaptoetanol** (Merck/Sigma, USA)

## 5.12 Aparatura i inne materiały

**Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej białek** (Sigma Aldrich, USA/ BIO-RAD, USA)

**Aparat do transferu półsuchego** (Sigma Aldrich, USA/ BIO-RAD, USA)

**Bibuła Whatman 3MM** (GE Healthcare, USA)

**Cytometr przepływowy Guava easyCyte** (Merck, USA)

**Cytometr przepływowy z przystawką sortującą FACS Calibur** (Becton Dickinson, USA)

**DS-11 spektrofotometr** (DeNovix, USA)

**Filtr  $\varnothing$  0,02  $\mu$ m,  $\varnothing$  0,45  $\mu$ m i  $\varnothing$  0,22  $\mu$ m (membrana z polifluorku winylidenu)** (Millipore, USA)

**Hemocytometr typu Thoma** (Medlab, Polska)

**Infinite<sup>®</sup> 200 PRO NanoQuant spektrofotometr z czytnikiem płytek** (TECAN, Niemcy)

**Inkubator 37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub>** (Heraeus, Niemcy)

**Komora laminarna** (Heraeus, Niemcy)

**Komorowe szkiełko nakrywkowe z 8 dołkami do hodowli komórkowych i przyżyciowych obserwacji mikroskopowych** (ibidi, Niemcy)

**Kuchenka mikrofalowa** (LG Electronics Inc., USA)

**Membrana PVDF** (Millipore, USA)

**Mikroskop elektronowy JEM 1400** (JEOL, Japan)

**Mikroskop elektronowy Tecnai G2 Spirit BioTWIN** (FEI Inc., USA)

**Mikroskop konfokalny laserowy skaningowy Leica TCS SP8X** (Leica Microsystems, Niemcy)

**Mikroskop świetlny** (Olimpus, Japonia)

**Mikrowirówka Biofuge fresco** (Heraeus Instrument, Niemcy)

**Mikrowirówka Biofuge pico** (Heraeus Instrument, Niemcy)

**Naczynia hodowlane** (płytki wielodołkowe M6, M12, butelki T25, T75, T175 płytki o średnicy 30 mm, 60 mm, 150 mm (Costar-Corning, USA/ BD Biosciences, USA)

**pH-metr Radiometr Analytical PHM 83 AUTOCAL** (Random, Dania)

**Pipety i probówki plastikowe 15ml i 50ml** (BD Bioscience, USA)

**Płytki do testów immunoenzymatycznych M96** (BD Biosciences, USA)

**Probówki i płytki do FACS M96** (Costar-Corning, USA)

**Probówki plastikowe 1,5ml i 2ml** (Sarstedt, Niemcy)

**Rotor uchylony SW28 oraz SW41** (Beckman-Coulter, USA)

**Strzykawka 10 ml** (Becton Dickinson, USA)

**System do wizualizacji i dokumentacji białek wybarwionych chemiluminescencyjnie UVITEC Cambridge Mini HD** (UVITEC Cambridge)

**System do wizualizacji kwasów nukleinowych w żelach agarozowych UVIDOC HD6** (UVITEC Cambridge)

**Szkiełka mikroskopowe** (ICN Biomedicals LTD, Wielka Brytania)

**Termoblok** (SigmaAldrich, USA)

**Termocykler Perkin Elmer 2400** (Perkin Elmer, USA)

**Transiluminator UV Spectroline TL-312A** (USA)

**Ultrawirówka Optima L-80** (Beckman-Coulter, USA)

**Waga analityczna** (MEDICAT, Szwajcaria)

**Waga analityczna** (Sartorius Mechatronics, Niemcy)

**Wirówka Heraeus Megafuge 16R** z rotorem F15-6 x 100y (Thermo Scientific, USA)

**Wirówka Hraeus Fresco 17** z rotorem o średnicy 17,2 cm (Thermo Scientific, USA)

**Wortex Heidolph Top-Mix 94323** (Bioblock Scientific, Francja)

**Zamrażarka -80°C** (Revco, USA)

**Zasilacz Biometra PowerPack P25** (Biometra, Niemcy)

**Zestaw filtrujący Amicon® Ultra-15 Centrifugal Units 100-K** (Merck, USA)

**Zestaw MycoAlert** (Lonza, Szwajcaria)

### 5.13 Bazy danych i oprogramowanie komputerowe

**Alliance-1D** program systemu do wizualizacji i dokumentacji białek wybarwionych chemiluminescencyjnie UVITEC Cambridge Mini HD

**CellQuest Pro** oprogramowaniem cytometru przepływowego FACS Calibur

**Chromas** program komputerowy dostępny w wersji on-line do analizy chromatografów  
<https://technelysium.com.au/wp/>

**Corel PHOTO-PAINT** program graficzny (Corel, Kanada)

**i-control** oprogramowanie urządzenia Infinite® 200PRO NanoQuant

**InCyte** oprogramowaniem cytometru przepływowego Guava

**Leica Application Suite X (LAS X)** oprogramowanie mikroskopu konfokalnego laserowego skaningowego Leica TCS SP8X

**National Center for Biotechnology Information (NCBI)** baza sekwencji nukleotydowych  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

**T-coffee** program komputerowy dostępny w wersji on-line do porównywania sekwencji nukleotydowych (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>)

**UVITEC-1D** program systemu do wizualizacji i dokumentacji kwasów nukleinowych w żelach agarozowych UVIDOC HD6

## 6 METODY

### 6.1 Metody pracy z DNA

#### 6.1.1 Izolacja DNA wirusowego

DNA wirusowy oczyszczano w celu przeprowadzenia transfekcji lub amplifikacji wybranych genów glikoprotein wirusowych, zgodnie z następującą procedurą. Konfluentne komórki linii MJS (dla HSV-1) lub MDBK (dla BoHV-1) w trzech butelkach T175 infekowano przy MOI 1.0 i inkubowano w warunkach hodowlanych aż do uzyskania zaawansowanego efektu cytopatycznego w postaci zaokrąglonych, odrywających się od podłoża, ale jeszcze nie zlizowanych komórek. Po tym czasie supernatant zawierający wiriony zbierano i wirowano 10 min przy 4000 rpm, aby usunąć z zawiesiny zanieczyszczenie komórkowe. Następnie wiriony osadzano za pomocą ultrawierwienia przez 2 h przy 130 000 g, w rotorze uchylnym SW28. Osad wirionów zawieszano w 0,9 ml buforu TE. DNA wirusa oczyszczano przy użyciu zestawu Virus mini AX Transfect zgodnie z zaleceniami producenta.

#### 6.1.2 Przygotowanie komórek kompetentnych

500 µl hodowli nocnej komórek TOP10 *Escherichia coli* wykorzystano, aby zaszczerpić 50 ml pożywki LB i hodowano z wytrząsaniem w temperaturze 37°C aż do uzyskania  $OD_{575} = 0,4-0,6$ . W celu osadzenia komórek hodowlę umieszczano w jałowych probówkach 50 ml i wirowano 10 min przy 4800 rpm i temperaturze 4°C. Osad komórek zawieszano w 10 ml schłodzonego 100 mM roztworu  $CaCl_2$  i inkubowano w lodzie przez 30 min. Następnie zawiesinę wirowano (10 min przy 4800 rpm i temperaturze 4°C), usuwano supernatant, a otrzymany osad zawieszano w 2 ml schłodzonego roztworu 100 mM  $CaCl_2$  + 5% glicerol. Przygotowane bakterie w porcjach o objętości 200 µl przenoszono do probówek 1,5 ml i zamrażano (-80°C). Przeprowadzając transformację kontrolną plazmidowym DNA sprawdzono stan kompetencji komórek.

### 6.1.3 Transformacja komórek bakteryjnych DNA plazmidowym

Komórki kompetentne TOP10 *Escherichia coli* rozmrażano w lodzie. Po rozmrożeniu do porcji komórek (200 µl) dodawano zwykle 100 ng plazmidowego DNA lub całość mieszaniny ligacyjnej i prowadzono 30-minutową inkubację w lodzie. Po tym czasie zawiesinę bakteryjną umieszczano kolejno w łaźni wodnej o temperaturze 42°C na 1,5 min, ponownie na 1 min w lodzie, następnie w szklanej probówce z 1 ml ogrzanej pożywki LB i inkubowano przez 1 h w temperaturze 37°C z wytrząsaniem. W dalszym etapie hodowlę bakteryjną wirowano 2 min przy 4000 rpm, następnie usuwano 1 ml pożywki nad osadu. 200 µl przygotowanego rozcieńczenia (1:10) komórek z plazmidem w pożywce, a dla mieszaniny ligacyjnej pozostałą zawiesinę, wysiewano na płytki z podłożem stałym LA oraz ampicyliną i inkubowano przez noc w temperaturze 37°C.

### 6.1.4 Oczyszczanie DNA plazmidowego

Izolacje DNA plazmidowego były prowadzone zgodnie z zaleceniami protokołu i z wykorzystaniem odczynników zestawów do izolacji DNA plazmidowego Plasmid Mini lub Plasmid Midi firmy A&A Biotechnology, których zasada działania oparta jest na zdolności wiązania się DNA do złóż krzemionkowych w obecności wysoko stężonych soli chaotropowych. DNA eluowano przez naniesienie na osuszoną kolumnę do izolacji DNA H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> o temperaturze ok. 50°C.

### 6.1.5 Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA

Reakcję łańcuchową polimerazy DNA (ang. PCR - *polymerase chain reaction*) przeprowadzano w celu powielenia odpowiednich sekwencji genów glikoprotein wirusowych. W zależności od celu amplifikacji stosowano polimerazę DNA WALK oraz odpowiednie startery reakcji zaprojektowane w oparciu o sekwencję nukleotydową genów glikoprotein wirusowych zdeponowane w bazie NCBI. Temperatury przyłączania starterów wyznaczono z wykorzystaniem aplikacji dostępnej na stronie internetowej dostawcy. Określono także prawdopodobieństwo tworzenia przez startery dimerów

czy struktur niespecyficznych. Reakcję PCR przeprowadzane w całkowitej objętości 50  $\mu$ l prowadzono w termocyklerze Perkin Elmer 2400.

<i>składnik mieszaniny reakcyjnej</i>	<i>ilość</i>
<b>10x bufor reakcyjny PCR</b>	5 $\mu$ l
<b>dNTP Mix (10 mM)</b>	250 $\mu$ M (1,25 $\mu$ l)
<b>Starter FW oraz REV</b>	0,1 $\mu$ M
<b>Walk polimeraza</b>	1 U
<b>Matryca DNA</b>	100 ng
<b>Woda jałowa</b>	uzupełniono do 50 $\mu$ l

<i>etap reakcji PCR</i>	<i>temperatura</i>	<i>czas</i>	
<b>wstępna denaturacja</b>	94 °C	3 min	
<b>denaturacja</b>	94 °C	30 sec	} 35 cykli
<b>hybrydyzacja</b>	wg zaleceń producenta	30 sec	
<b>elongacja</b>	72 °C	2 min/kpz	
<b>elongacja końcowa</b>	72 °C	5 min	

### 6.1.6 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

W celu przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego DNA w żelu agarozowym przygotowywano żele o zawartości 1% agarozy, rozpuszczanej w roztworze TAE 1x stężonym przez podgrzanie przy użyciu kuchenki mikrofalowej. Po schłodzeniu roztworu agarozy do temperatury ok. 50°C, dodawano fluorescencyjny barwnik do wizualizacji kwasów nukleinowych Simply Safe™ (5  $\mu$ l/100 ml żelu). Całość przelewano do przygotowanej wcześniej formy z grzebieniem, a po zastygnięciu mieszaniny i usunięciu grzebienia umieszczano w aparacie do elektroforezy wypełnionym buforem TAE 1x stężonym. Do studzienek żelu nanoszono próbki DNA z dodatkiem buforu obciążającego oraz wybrany wzorzec wielkości i ilości DNA. Rozdział elektroforetyczny prowadzono



przy napięciu 10-15V na każdy centymetr długości żelu, a po jego zakończeniu rezultat obserwowano w świetle UV transiluminatora i dokumentowano z zastosowaniem systemu UVIDOC HD6.

#### *6.1.7 Izolacja DNA z żelu agarazowego*

Do izolacji DNA z żelu agarazowego użyto komercyjnie dostępnego zestawu Gel-Out firmy A&A Biotechnology. Bloczek żelu agarazowego zawierający odpowiedni fragment DNA wycięty skalpelem umieszczono w probówce 1,5 ml. Następnie, postępując zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta, dodano roztwór R7S, który dzięki obecności soli chaotropowych umożliwia rozluźnienie struktury agarozy i wiązanie się DNA do ziół krzemionkowych. Roztwór inkubowano w temperaturze 50°C aż do całkowitego rozpuszczenia się agarozy. Następnie do mieszaniny dodano izopropanol, a całość naniesiono na kolumnę do izolacji DNA i wirowano. DNA związany ze złożem krzemionkowym płukano dwa razy roztworem A1 i eluowano 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> o temperaturze ok. 50°C.

#### *6.1.8 Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych*

DNA oczyszczano za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu Clean-up firmy A&A Biotechnology, Polska, który podobnie opiera się na wiązaniu DNA do złoża krzemionkowego w wysokim stężeniu soli chaotropowych. Postępując zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta, do mieszaniny po reakcji enzymatycznej dodano roztworu G w pięciokrotnie większej objętości. Całość naniesiono na kolumnę do oczyszczania DNA i wirowano 30 s przy 1300 rpm, a następnie dwukrotnie płukano roztworem A1. DNA eluowano 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> o temperaturze ok. 50°C.

#### *6.1.9 Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi*

Zgodnie z zaleceniami producenta stosowanych odczynników reakcje przeprowadzano w temperaturze 37°C, jeśli nie podano inaczej.

Przeprowadzano dwa rodzaje trawień:

- trawienie preparatywne –większej ilości DNA (1-4 µg), przeprowadzane w objętości 40 µl przez noc,
- trawienie analityczne oczyszczonego DNA (np. w analizie restrykcyjnej) – zwykle ok. 1 µg DNA poddawano reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi w objętości 20 µl przez noc lub 1 h przy użyciu enzymów FastDigest.

#### *6.1.10 Defosforylacja 5' wystających końców DNA przy użyciu antarktycznej fosfatazy*

Wykorzystano buforę dostarczoną przez producenta i postępowano zgodnie z instrukcją. Po dodaniu pierwszej porcji enzymu do mieszaniny reakcyjnej o objętości 40 µl prowadzono inkubację przez 30 min w temperaturze 37°C, a po upływie tego czasu dodano kolejną porcję fosfatazy i inkubowano w tych samych warunkach przez następne 30 min. Enzym inaktywowano termicznie w temperaturze 65°C przez 10 min po dodaniu 2 µl 0,5 M EDTA. Defosforylowany DNA oczyszczono z wykorzystaniem zestawu Clean-up.

#### *6.1.11 Ligacja fragmentów DNA za pomocą ligazy DNA faga T4*

Przeprowadzano dwa rodzaje reakcji ligacji fragmentów DNA z wykorzystaniem ligazy DNA faga T4, wchodzącej w skład zestawu firmy Thermo Scientific:

- ligację fragmentów o wystających końcach
- ligację fragmentów z „tępymi” końcami.

W obu przypadkach stosunek ilościowy wektorowego DNA do insertu DNA wynosił 1: 3, a warunki reakcji i stosowane odczynniki zastosowano zgodnie z zaleceniami producenta. W przypadku ligacji „tępych” końców mieszaninę inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej, natomiast ligację wystających końców nastawiano na noc w temperaturze 16°C. Do transformacji bakterii używano całości mieszaniny ligacyjnej.

## 6.2 Metody pracy z komórkami ssaczymi

### 6.2.1 Hodowle linii komórek ssaczyc

Hodowle komórek ssaczyc prowadzono na płytkach lub w butelkach polistyrenowych w odpowiedniej dla danej linii komórkowej pożywce hodowlanej z dodatkiem bydlęcej surowicy płodowej (FBS) o stężeniu 8-20%, roztworu antybiotyków oraz L-glutaminy w temperaturze 37°C i atmosferze nasyconej CO<sub>2</sub> do stężenia 5%. Aby dokonać pasażu wybranej linii komórkowej, komórki płukano buforem PBS i poddawano trypsynizacji w roztworze trypsyny. Zawiesinę komórek umieszczano w pożywce z FBS (w celu neutralizacji trypsyny), następnie komórki liczono i w wymaganym rozcieńczeniu umieszczano w nowym naczyniu hodowlanym. Linie komórkowe poddawano regularnym testom na obecność mykoplazm przy użyciu zestawu luminescencyjnego MycoAlert.

### 6.2.2 Namnażanie i miareczkowanie wirusa (ang. plaque assay)

Pożywkę z nad komórek zebrano i zastąpiono minimalną (niezbędną do przykrycia komórek) objętością pożywki bez FBS zawierającej wirusa. Inkubację prowadzono godzinę w temperaturze 37°C wraz z 5% CO<sub>2</sub>. Następnie zawiesinę zastąpiono odpowiednią objętością świeżej pożywki z FBS. Hodowlę prowadzono do uzyskania pełnego efektu cytopatycznego, lizy komórek, po czym zbierano lizat z cząstkami wirusowymi, odwirowywano przez 5 min przy 2500 rpm, porcjowano i przechowywano w zamrażarce (-80°C). W celu oznaczenia miana wirusa wykonano seryjne rozcieńczenia zawiesiny wirusa (od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-8</sup>) w pożywce bez FBS i nanoszono na jednowarstwowe hodowle komórek przygotowanych na płytkach 6-dołkowych. Po godzinnej inkubacji komórki płukano buforem PBS i pokrywano 1% roztworem metylocelulozy w pożywce. Po 48 godzinach od infekcji metylocelulozę usuwano, a komórki przemywano PBS. W celu wizualizacji łysinek wirusa nanoszono roztwór 1% fioletu krystalicznego w 50% etanolu (w/v), prowadząc inkubację przez 20 min w temperaturze pokojowej. Komórki przemywano i po wysuszeniu liczono łysinki. Miano wirusa (ang. *PFU- plaque-forming unit*) wyznaczono według wzoru:

$$\text{PFU/ml} = \frac{\text{liczba łysinek}}{\text{rozcieńczenie} \times \text{objętość rozcieńczenia}}$$

### *6.2.3 Transfekcja komórek pakujących GP2-293 kompleksami DNA z fosforanem wapnia*

Do transfekcji stosowano gotowe bufony z zestawu Calcium Phosphate transfection firmy Takara/Clontech.  $1 \times 10^6$  komórek GP2-293 wysiano na płytce o średnicy 60 mm. 24 h przed przystąpieniem do procedury. W dniu transfekcji przygotowano mieszaninę plazmidowego DNA: pLZRS-IRES- $\Delta$ NGFR-gB lub pBABEpuro i pCMV-VSV-G w ilości 15  $\mu$ g (w stosunku ilościowym 2:1) oraz 37  $\mu$ l 2M CaCl<sub>2</sub> uzupełnioną H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> do całkowitej objętości 300  $\mu$ l, którą dodawano kroplami do umieszczanego na wytrząsarce laboratoryjnej 300  $\mu$ l 2x stężonego buforu HBS. Po uprzedniej zmianie pożywki, komórki transfekowano przygotowaną mieszaniną i prowadzono inkubację przez noc w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Następnego dnia zbierano supernatant, komórki płukano pożywką, dodano świeżą pożywkę i prowadzono dalszą 48-godzinną hodowlę w 37°C w przy 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>. Po tym czasie supernatant z komórek zawierający cząstki retrowirusowe zbierano do jałowej probówki 15 ml i wirowano przez 7 min przy 3000 rpm. Uzyskany supernatant filtrowano z użyciem filtra strzykawkowego z membraną PVDF o średnicy porów 0,45  $\mu$ m i wykorzystano do przeprowadzenia transdukcji komórek ssaczych.

### *6.2.4 Transdukcja retrowirusowa*

Do jałowej probówki 15 ml zawierającej zawiesinę komórek w liczbie  $2 \times 10^5$  dodano 40  $\mu$ l roztworu polibrenu i uzupełniono pożywką do objętości 1 ml. Następnie połączono powstały roztwór z 1 ml supernatantu z wektorem retrowirusowym i wysiano na płytkę hodowlaną o średnicy 30 mm. Po 24 h dokonano zmiany pożywki, a po uzyskaniu przez komórki pełnej konfluencji przeniesiono do butelki hodowlanej T75. Wydajność transdukcji sprawdzano za pomocą cytometrii przepływowej na podstawie określenia procentu komórek ekspresujących gen receptora  $\Delta$ NGFR. W przypadku linii komórkowych z wprowadzonym genem oporności antybiotykowej stosowano selekcję puromycyną przez kolejne 2 tygodnie, zmieniając medium co 2-3 dni. Ustalone końcowe stężenie antybiotyku w medium hodowlanym wynosiło 2  $\mu$ g/ml dla komórek MJS, SK6 i 4  $\mu$ g/ml dla komórek MDBK.

### 6.2.5 Sortowanie komórek ssaczych

$6 \times 10^6$  komórek zebranych z uzyskanej hodowli, zawieszono w buforze PBS i przenoszono do probówki 50 ml. Następnie komórki wirowano przez 4 min przy 1200 rpm i dodawano sterylny roztwór przeciwciał pierwszorzędowych anti-NGFR (1:1000) w 1 ml 0,5% BSA w PBS. Po godzinnej inkubacji w lodzie, zawiesinę komórek płukano 3-krotnie 0,5% BSA w PBS, przez wirowanie, a następnie dodawano sterylny roztwór koniugatu przeciwciał anti-mysich z fikoerytryną. Po 45-minutowej inkubacji, w lodzie bez dostępu światła, zawiesinę komórek płukano 3-krotnie 0,5% BSA w PBS. Wybarwione komórki zawieszono w 1,5 ml buforu PBS i przeniesiono do jałowych probówek cytometrycznych. Dokonano segregacji komórek z wykorzystaniem przystawki sortującej cytometru FACSCalibur. Komórki NGFR-pozytywne zbierano do jałowej probówki 50 ml, zawierającej 4 ml FBS (probówki używane do zbierania komórek po sorcie blokowano przez noc w roztworze 4% BSA w PBS z 0,1%  $\text{NaN}_3$  w  $4^\circ\text{C}$ ). Po zakończeniu procedury selekcji zawiesinę komórek wirowano przy 2800 rpm przez 8 min, supernatant usuwano, a do osadu komórek dodawano 5 ml pożywki suplementowanej antybiotykami. Hodowlę prowadzono początkowo w butelce hodowlanej T25, a po osiągnięciu pełnej konfluencji w butelce hodowlanej T75. Prawidłowy przebieg procedury selekcji sprawdzano zgodnie z protokołem standardowej analizy cytometrycznej.

### 6.2.6 Cytometria przepływowa

Komórki wysiewano na płytkę 6-dołkową. Następnego dnia komórki trypsynizowano i zbierano do buforu PBS, wirowano 1200 rpm przez 4 minuty, a uzyskany osad zawieszono w 100  $\mu\text{l}$  buforu PBA na każde  $3 \times 10^5$  komórek. Komórki przenoszono na płytkę 96-dołkową i wirowano przez 3 minuty przy 1300 rpm i  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant usuwano, a osad zawieszono w 100  $\mu\text{l}$  roztworu odpowiednich przeciwciał pierwszorzędowych w PBA. Komórki inkubowano z przeciwciałami w lodzie przez 1 h. Po tym czasie trzykrotnie płukano 200  $\mu\text{l}$  PBA, przez wirowanie, i dodano 100  $\mu\text{l}$  przeciwciał drugorzędowych. Inkubację prowadzono bez dostępu światła, na lodzie przez 45 minut po czym płukano komórki 3 razy buforem PBA. Wybarwione komórki zawieszono w 400  $\mu\text{l}$  PBA, przeniesiono do probówek cytometrycznych i analizowano w cytometrze przepływowym

FACSCalibur lub Merck/Guava easyCyte, korzystając odpowiednio z oprogramowania CellQuest Pro lub InCyte.

### *6.2.7 Przygotowanie lizatów komórkowych*

Komórki poddawano trypsynizacji, zbierano do buforu PBS i wirowano przez 3 min przy 8000 rpm. PBS nad komórek usunięto, a do osadu dodano odpowiednią ilość buforu lizującego NP-40 z dodatkiem inhibitorów proteaz i jodoacetamidu ( $10^6$  komórek/15  $\mu$ l lub  $10^6$  komórek/100  $\mu$ l w przypadku lizatów przeznaczonych do reakcji immunoprecypitacji). Próbkę inkubowano 45 min w lodzie, a następnie wirowano przez 20 min przy 4°C, przy 13000 rpm. Supernatant przenoszono do nowych probówek i przechowywano w temperaturze -80°C.

### *6.2.8 Barwienie immunofluorescencyjne komórek i mikroskopia konfokalna*

Jałowe szkiełka mikroskopowe umieszczano w dołkach płytki 12-dołkowej, do których wysiewano komórki wybranych linii komórkowych w liczbie  $3 \times 10^5$  komórek/studzienkę. Kolejnego dnia zbierano pożywkę nad komórek, płukano je buforem D-PBS i utrwalano w 4% roztworze paraformaldehydu w PBS, inkubując 20 min w temperaturze 4°C. Następnie trzykrotnie przemywano komórki buforem PBS i pozostawiano pod PBS na noc w temperaturze 4°C lub przystępowano do kolejnego etapu procedury. W dalszym etapie permeabilizowano błony komórkowe 0,2% roztworem TritonX-100 w PBS przez 8 minut, dwukrotnie płukano komórki buforem PBS i inkubowano 30 minut w roztworze blokującym 1% BSA w PBS, w temperaturze pokojowej. W tym czasie przygotowywano roztwory przeciwciał I-rzędowych w 1% BSA w PBS, które dodawano do komórek po usunięciu roztworu blokującego i prowadzono inkubację przez 1,5 h na rotatorze horyzontalnym. W dalszej kolejności, po usunięciu roztworu przeciwciał I-rzędowych, trzykrotnym płukaniu buforem PBS, komórki inkubowano przez godzinę na rotatorze horyzontalnym, w ciemności z roztworami przeciwciał II-rzędowych skoniugowanych z fluorochromami przygotowanymi w 1% BSA w PBS. Ostatecznie komórki płukano trzykrotnie buforem PBS.

Szkietka z dołków płytki umieszczano i unieruchamiano na szkiełkach podstawowych z wykorzystaniem odczynnika ProLong Diamond Antifade Mountant. Uzyskane w ten sposób preparaty pozwalały na przeprowadzenie obserwacji mikroskopowych przy użyciu mikroskopu konfokalnego laserowego skaningowego Leica TCS SP8X. Poziom ko-lokalizacji wyznaczano za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X z funkcją obliczeniową współczynnika korelacji Pearsona (ang. *Pearson correlation coefficient*).

## 6.3 Metody pracy z białkami

### 6.3.1 Immunoprecypitacja

Immunoprecypitację prowadzono z wykorzystaniem złoża Sepharose-Protein A. W probówce 1,5 ml przygotowano 40  $\mu$ l zawiesiny złoża zrównoważonego buforem NET, a następnie dodawano 450  $\mu$ l lizatów komórkowych, odpowiednie przeciwciała w zależności od immunoprecypitowanych białek oraz bufor NET do całkowitej objętości 600  $\mu$ l. Po nocnej inkubacji mieszaniny w 4°C na mieszadle obrotowym złożo wirowano przez 3 min przy 8000 rpm w 4°C i płukano trzykrotnie buforem NET, przez wirowanie. Próbkę zawieszono buforze lizująco-obciążającym i inkubowano 5 minut w 100°C, następnie wirowano przez 3 minuty przy 8000 rpm w 4°C. Zebrany supernatant analizowano za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej i techniki Western blotting.

### 6.3.2 Biochemiczna analiza N-glikozylacji białek

Do zdenaturowanych przez dodanie buforu obciążająco-lizującego i inkubację przez 5 min w 100°C lizatów komórek dodano odpowiednią ilość enzymu PNGazy F (2  $\mu$ l/reakcję) lub EndoH (2  $\mu$ l/reakcję), dedykowanego im buforu (odpowiednio G7 i G5) oraz detergentu NP-40, zgodnie z rekomendacją producenta. Przygotowaną mieszaninę inkubowano przez noc w temperaturze 37°C. Następnego dnia do mieszaniny dodawano ponownie 4x stężony bufor obciążająco-lizujący i inkubowano przez 5 min w 100°C. Przygotowany w ten sposób materiał analizowano za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej i techniki Western blotting.

### 6.3.3 Elektroforeza poliakryloamidowa białek w warunkach denaturujących

W celu przeprowadzenie elektroforezy poliakryloamidowej białek w warunkach denaturujących (ang. *SDS-PAGE*) przygotowano w zależności od masy rozdzielanych białek: 8%, 10% lub 12% żel rozdzielający i 5% żel zagęszczający, umieszczany w aparacie do elektroforezy i zalewany buforem elektrodowym. Przed umieszczeniem analizowanego materiału w studzienkach do próbek dodawano bufor obciążająco-lizujący (4x lub 6x stężony z dodatkiem lub bez  $\beta$ -merkaptoetanolu w zależności od pożądanych bądź nie warunków redukujących reakcji) i mieszaninę inkubowano przez 5 min w temperaturze 100°C. Jako wzorca mas używano PageRuler lub Pager Ruler Plus Prestained Protein Ladder. Początkowo rozdzielanie prowadzono przy napięciu 80V aż do momentu, gdy wzorzec wielkości przekroczył granicę żeli. Następnie zwiększono napięcie prądu do 180V. Rozdział trwał do chwili, kiedy czoło próbek widoczne przez dodanie barwnika – błękitu bromofenolowego – sięgało końca żelu.

### 6.3.4 Western blotting

Po zakończonym rozdzielaniu elektroforetycznym białek w warunkach denaturujących przystępowano do przeprowadzenia transferu (półsuchego) białek z żelu poliakryloamidowego na błonę PVDF. W tym celu przygotowywano fragment błony PVDF oraz 8 fragmentów bibuły Whatmann o wymiarach odpowiadających wielkości żelu. Poszczególne elementy (błonę PVDF aktywowaną w metanolu, równoważoną w buforze do transferu białek z żelu na błonę PVDF i fragmenty bibuły nasączone roztworem buforu do transferu białek z żelu na błonę PVDF) układano w następującej kolejności: 4 fragmenty bibuły, błona PVDF, żel poliakryloamidowy, 4 fragmenty bibuły. Całość, przy zachowaniu odpowiedniej orientacji względem elektrod, umieszczano w aparacie do transferu półsuchego i prowadzono transfer przez godzinę przy 15V. Błonę PVDF po transferze białek blokowano przez noc w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w PBST w temperaturze 4°C. Kolejnego dnia usuwano roztwór blokujący i dodawano roztwór przeciwciał I-rzędowych w 2,5% odtłuszczonego mleka w PBST. Inkubację prowadzono przez godzinę w temperaturze pokojowej na rotatorze horyzontalnym, po czym trzykrotnie płukano błonę w buforze PBST. Następnie dodano roztwór odpowiednio gatunkowo specyficznych skoniugowanych



z peroksydazą chrzanową przeciwciał II-rzędowych w 2,5% odtłuszczonym mleku PBST, inkubowano godzinę w temperaturze pokojowej na rotatorze horyzontalnym i ponownie płukano buforem PBST. Detekcję kompleksów białko-przeciwciało-koniugat wykonano z użyciem zestawu Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate oraz klisz światłoczułych bądź aparatu do wizualizacji obrazów chemiluminescencyjnych UVITEC Cambridge MINI HD.

### *6.3.5 Test immunoenzymatyczny ELISA (ang. ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay)*

Płytkę 96-dołkową opłaszczono antygenem: lizatem komórkowym lub preparatem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w ilości 25 µg na studzienkę. Inkubację antygeny na płycie prowadzono przez 16 h w temperaturze 4°C, po czym do każdej studzienki dodawano roztwór blokujący PBS z 5% (w/v) BSA i kontynuowano inkubację przez 24 h w temperaturze 4°C. Następnie w celu detekcji antygeny dodawano kozią surowicę poliklonalną anti-IBR/BoHV-1 w rozcieńczeniu 1:9000 przygotowaną w roztworze TPBS z 0.1% (w/v) BSA. Po 16 h inkubacji w temperaturze 4°C niezwiązane przeciwciała usunięto przez trzykrotne płukanie buforem TPBS i dodawano roztwór przeciwciał anti-kozich skoniugowanych z enzymem peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:500 w roztworze TPBS z 0.1% (w/v) BSA i inkubowano przez 1h w temperaturze pokojowej. W dalszej kolejności trzykrotnie płukano studzienki buforem TPBS i dodano substrat dla kolorymetrycznej reakcji enzymatycznej – wodę utlenioną z 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyną (TMB) w ilości 150 µl na studzienkę. Po 15 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej i zaobserwowaniu wyraźnej reakcji barwnej, w celu zablokowania aktywności enzymatycznej peroksydazy chrzanowej dodano roztwór 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 µl na studzienkę). Absorbancję mierzono w automatycznym czytniku płytek Infinite® 200PRO NanoQuant (Tecan, Männedorf, Switzerland) przy długości fali 450 nm.

## 6.4 Metody pracy z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi

### 6.4.1 Izolacja i oczyszczanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

#### 6.4.1.1 Ultrawierowanie

Komórki wysiano na płytkę hodowlaną o średnicy 150 mm. Przy 70% konfluencji hodowli dokonywano zmiany pożywki na Hybridomed, niezawierającej bydlęcej surowicy płodowej i kontynuowano inkubację w warunkach odpowiadających prowadzeniu hodowli komórek ssaczych przez 48 godzin. Po tym czasie zebrano pożywkę do jałowych probówek 50 ml i wirowano przy 300 g przez 10 minut, a następnie przy 2000 g przez kolejne 20 minut, by wyeliminować pozostałości komórkowe (fragmenty błon, organella komórkowe). Duże pęcherzyki eliminowano przez kolejne wirowanie przy 10 000 g przez 30 minut. Następnie supernatant wirowano przy 100 000 g (rotor SW28) przez 1,5 h w 4°C w celu osadzenia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na dnie probówki. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w schłodzonym buforze PBS (poddanym wcześniej filtracji przez filtr o średnicy porów 0,02 µm) i przenoszono do nowych probówek do ultrawierowania i wirowano 100 000 g (rotor SW41) przez 1,5 h w 4°C, przepłukując w ten sposób osad pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W ostatnim etapie supernatant usuwano, a osad zawierający pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zawieszano w 200 µl użytego wcześniej buforu PBS i po przeniesieniu w porcjach 50 µl do probówek 1,5 ml przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

#### 6.4.1.2 Chromatografia wykluczania (ang. SEC – size exclusion chromatography)

Procedurę rozpoczynano jak w przypadku stosowania ultrawierowania do momentu zebrania supernatantu po wirowaniu przy 10 000 g przez 30 minut. Następnie supernatant filtrowano z użyciem filtra o średnicy 0,45 µm (aby usunąć frakcję większych pęcherzyków) i zredukowano do objętości 1 ml przez ultrafiltrację z wykorzystaniem zestawu filtrującego Amicon Ultra-15 Centrifugal Units 100-K. W kolumnie chromatograficznej (10 ml plastikowa strzykawka) uformowano złożę Sepharose CL-4B o wymiarach 16 mm x 62 mm zawieszane w buforze PBS z 0,32% (w/v) cytrynianu trisodowego o pH 7.4 (filtrowanego przez filtr o średnicy porów 0,02 µm). W dalszej kolejności наносzono zagęszczony supernatant zawierający pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i prowadzono elucję buforem PBS z 0,32% (w/v)

cytrynianiu trisodowego do zebrania kolejnych dwudziestu pięciu 0,5 ml frakcji, które następnie przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

#### *6.4.1.3 Izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowli komórek infekowanych wirusem z wykorzystaniem ultrawierowania w gradiencie jodiksanolu (OptiPrep™)*

Hodowle komórek wysianych na płytkach hodowlanych o średnicy 150 mm płukano buforem PBS. Następnie infekowano komórki dodając pożywkę pozbawioną surowicy bydlęcej (Hybridomed) zawierającą cząstki wirusowe zgodnie z wybraną wartością współczynnika infekcji MOI (ang. *MOI - multiplicity of infection*) i prowadzono 2 h inkubację w temperaturze 37°C wraz z 5% CO<sub>2</sub>. Następnie inokulum wirusowe usuwano i zastępowano odpowiednią ilością świeżej pożywki pozbawionej surowicy bydlęcej. Hodowlę prowadzono przez 48h, po tym czasie supernatant został poddany serii wirowań (jak w przypadku standardowej izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych: 300 g/10 minut, 2000 g/20 minut, 10 000 g/30 minut), filtrowaniu i zagęszczeniu do objętości 0,5 ml. W ten sposób przygotowany supernatant naniesiono na górną warstwę utworzonego w probówce do ultrawierowania gradientu gęstości w zakresie od 6% do 18% jodiksanolu (z przyrostem 1,2% każdej fazy) o objętości 11 ml. Frakcje roztworu jodiksanolu przygotowano przez rozcieńczenie 60% roztworu jodiksanolu w buforze 10mM Tris-HCl o pH 8,0 i 0,25 M sacharozy. W dalszej kolejności przystępowano do ultrawierowania przygotowanych próbek przy 200 000 g (rotor SW41) przez 5h w temperaturze 4°C. Po zakończonym wirowaniu w układzie góra-dół zebrano do 1,5 ml probówek dwadzieścia dwie frakcje o objętości 0,5 ml każda, które następnie przechowywano w -80°C do dalszych analiz.

#### *6.4.2 Mikroskopia elektronowa*

W celu wizualizacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i cząstek wirusowych z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej kroplę 10 µl analizowanego materiału umieszczano na niklowej siatce pokrytej węglem z kwadratową strukturą (adsorbcja przez 2 minuty). Barwienie wykonano z użyciem 2% roztworu octanu uranylu – przez 10 sek. Następnie dokonywano obserwacji mikroskopowej przygotowanych preparatów przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego Tecnai G2 Spirit BioTWIN

(FEI Inc., Hillsboro, OR, USA) przy 120kV w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego lub JEM 1400 (JEOL, Akishima, Japan) przy 80kV w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

#### *6.4.3 Test internalizacji izolowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki ssacze (ang. extracellular vesicles uptake)*

W pierwszym etapie preparat pęcherzyków zewnątrzkomórkowych poddano barwieniu z wykorzystaniem zestawu PKH67 Green Fluorescent Cell Linker do ogólnego znakowania błon komórkowych. Postępując zgodnie z zaleceniami producenta próbkę zawierającą pęcherzyki zewnątrzkomórkowe rozcieńczono w rozpuszczalniku C w stosunku 1:10, następnie dodano barwnik PKH67 w rozcieńczeniu 1:1000 i prowadzono 5-minutową inkubację w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Reakcję blokowano przez dodanie roztworu PBS z 1% (w/v) BSA. W celu usunięcia niezwiązanego barwnika z roztworu, mieszaninę rozcieńczono dziesięciokrotnie w buforze PBS i poddano ultrafiltracji z wykorzystaniem zestawu filtrującego Amicon Ultra-15 Centrifugal Units 100-K. Kontrolnie dokonano obserwacji mikroskopowej (mikroskop fluorescencyjny Leica TCS SP8X) zabarwionego materiału w kropli naniesionej na szkiełko podstawowe. Następnie komórki linii Huh-7 wysiano na 8-dołkową płytkę do obserwacji przyżyciowych. Po zaobserwowaniu 60% konfluencji dodawano przygotowaną w 200 µl pożywki pozbawionej surowicy bydlęcej (Hybridomed), porcję 10 µg preparatu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i prowadzono rejestrowaną w czasie 3 h, 6 h i 15h obserwację mikroskopową. W dalszej kolejności po usunięciu medium z preparatem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz trzykrotnym płukaniu komórek buforem PBS dodawano 200 µl świeżego medium z dodatkiem 5 µl LysoTracker Red DND-99 i dokonano ponownie obserwacji mikroskopowej uzyskując obrazy mikroskopowe w trybie „z-stack” wykorzystane następnie do rekonstrukcji obrazu mikroskopowego w przestrzeni trójwymiarowej. Doświadczenie prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego laserowego skaningowego Leica TCS SP8X przy zachowaniu temperatury 37°C i atmosfery nasyconej CO<sub>2</sub> do 5%.

## 7 WYNIKI

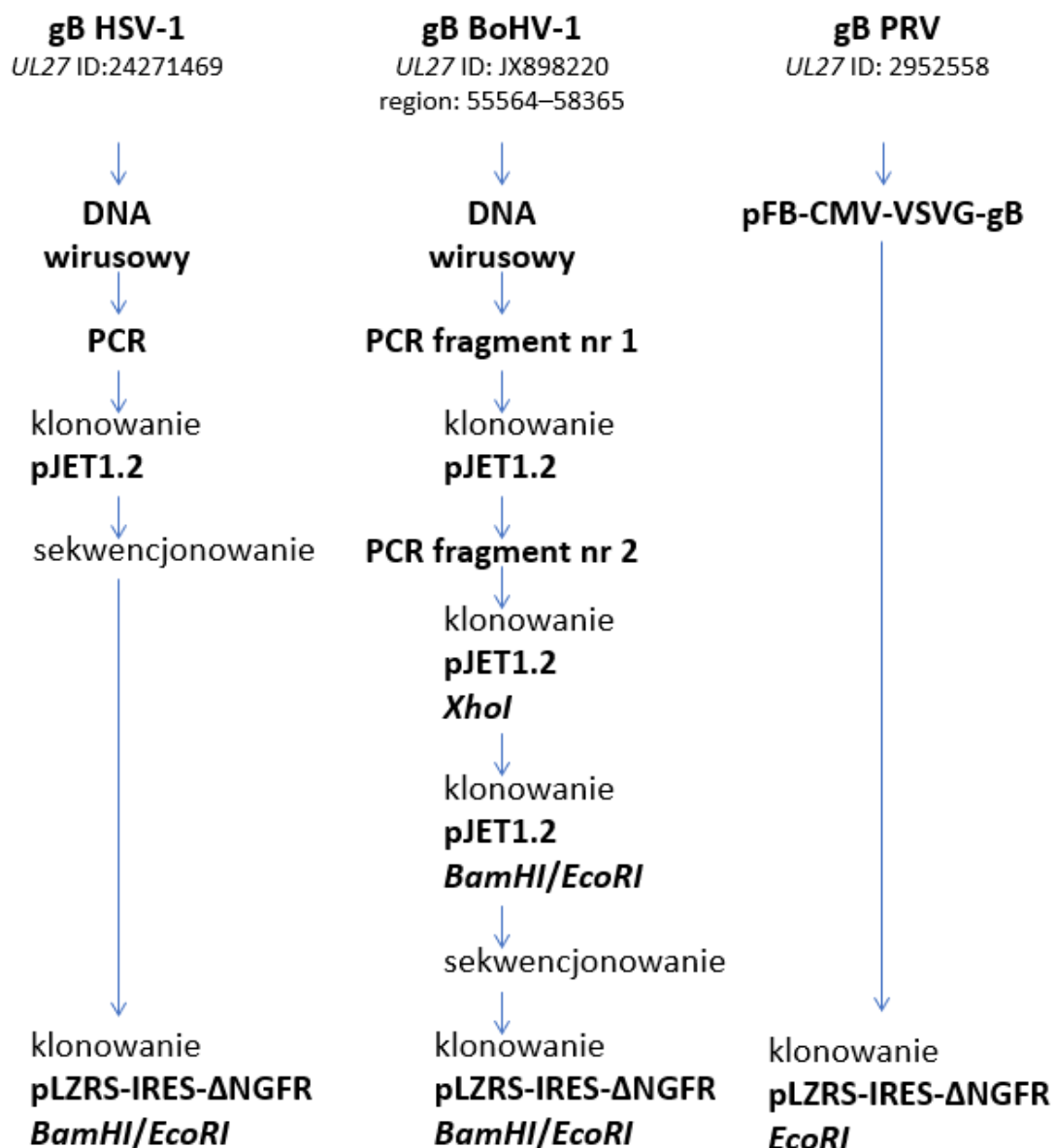
### 7.1 Badanie lokalizacji glikoproteiny B wybranych przedstawicieli alfaherpeswirusów na szlaku endosomalno-egzosomalnym

#### 7.1.1 *Konstrukcja linii stabilnych z konstytutywną ekspresją genu gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV przy pomocy wektorów retrowirusowych*

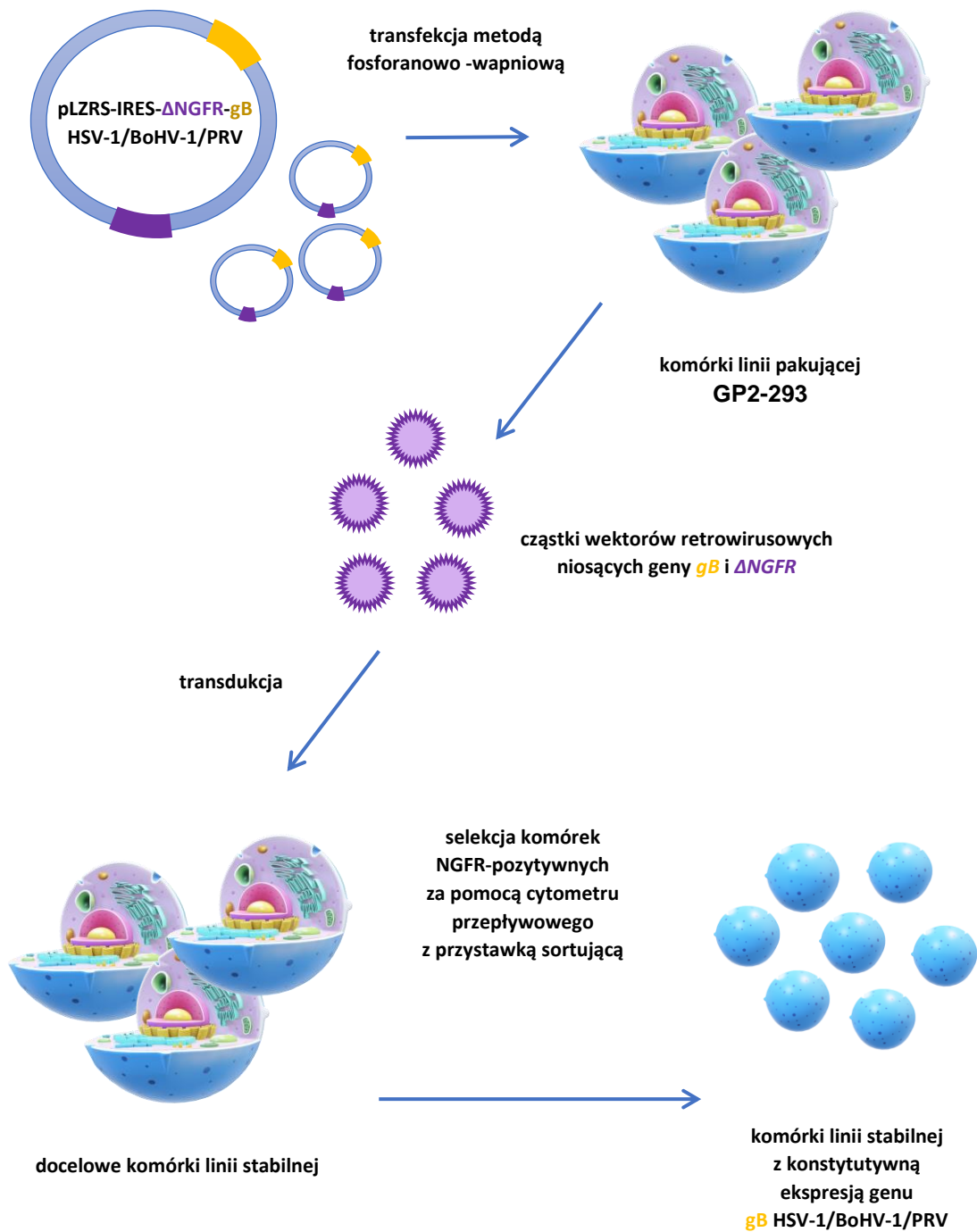
W celu obserwacji lokalizacji glikoproteiny B wybranych przedstawicieli alfaherpeswirusów na szlaku endosomalno-egzosomalnym przygotowano jako model badawczy zestaw linii stabilnych komórek ssaczych z konstytutywną ekspresją wybranych homologów genu gB. Przyjęta strategia pozwoliła na zbadanie w układzie izolowanym interakcji gB z białkami komórki gospodarza. Analizy takich oddziaływań mogą, w przypadku infekcji wirusowych, stanowić wyzwanie techniczne. Ograniczenia w przypadku alfaherpeswirusów wynikają, m.in. z ich stosunkowo krótkiego cyklu replikacyjnego, prowadzącego do lizy komórki gospodarza. Strategię opartą na liniach stabilnych wybrano dodatkowo z powodu planowanej izolacji EVs z rekombinowanych komórek ssaczych produkujących gB. Otrzymywanie EVs zwykle wymaga zastosowania dużej liczby komórek, co czyni linie z konstytutywną ekspresją rozwiązaniem ekonomicznie korzystnym, np.: w porównaniu z transfekcją komórek plazmidem ekspresyjnym.

W pierwszym etapie badań, na drodze klonowania molekularnego przygotowano zestaw plazmidów przenoszących gen gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV (**Rycina 11**). Do skonstruowania plazmidów z genami gB (*UL27*) HSV-1 i BoHV-1 jako matrycę do amplifikacji genu wykorzystano wyizolowany DNA wirusowy. Następnie, przez klonowanie produktu reakcji PCR do plazmidu pJET1.2 i potwierdzenie zgodności sekwencji nukleotydowej ze zdeponowanymi w bazie NCBI przez sekwencjonowanie oraz analizę bioinformatyczną (Chromas, T-coffee), przeprowadzono kolejne klonowanie, z wykorzystaniem odpowiednich miejsc restrykcyjnych, do docelowego plazmidu pLZRS-IRES- $\Delta$ NGFR. W przypadku konstruktów gB BoHV-1 optymalizacja amplifikacji pełnej sekwencji w jednej reakcji PCR była niemożliwa do przeprowadzenia i gen gB pozyskano w dwóch fragmentach, łącząc je poprzez klonowanie z wykorzystaniem plazmidu pJET1.2 i miejsca restrykcyjnego *Xho*I, obecnego w genie. Plazmid pLZRS-IRES- $\Delta$ NGFR z genem gB PRV uzyskano przez jednoetapowe klonowanie z plazmidu pFB-CMV-VSVG-gB znajdującego się w kolekcji Zakładu Biologii Molekularnej

Wirusów MWB UG-GUMed (Grabowska i wsp., 2009) do plazmidu docelowego z wykorzystaniem miejsca restrykcyjnego *EcoRI*, sprawdzając, za pomocą rozdziatu elektroforetycznego produktów trawienia enzymatycznego, poprawną orientację genu w konstrukcie. Zestaw plazmidów przenoszących gen gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV posłużył do transfekcji komórek pakujących i otrzymania cząstek retrowirusowych. Uzyskanymi wektorami retrowirusowymi następnie transdukowano wybrane komórki ssaczych linii komórkowych (**Rycina 12**).







**RYCINA 11. Schemat klonowania homologów alfa herpeswirusowych genu gB/UL27 do plazmidu retrowirusowego.** ID – oznaczenie zdeponowanego genomu w bazie NCBI, region – pozycje nukleotydowe w genomie wirusa, pJET1.2 – wektor do klonowania produktów PCR.



**RYCINA 12. Konstrukcja linii stabilnych komórek ssaczych z konstytutywną ekspresją homologów genu glikoproteiny B. Schemat obrazujący procedurę uzyskiwania linii stabilnych za pomocą systemu retrowirusowego (opis w tekście).**

Wśród przygotowanych stabilnych linii komórkowych znajdowały się linie gatunkowo-specyficzne dla danego wirusa oraz linia komórek ludzkiego czerniaka, jako permissywna dla trzech badanych alfaherpeswirusów (**Rycina 13**):

- **MeIJuSo (MJS)** – linia ciągła komórek ludzkiego czerniaka, powszechnie wykorzystywana do badań nad cząsteczkami MHC klasy II ze względu na konstytutywną produkcję tych białek (van Lith i wsp., 2001), ponadto permissywna zarówno dla wirusa BoHV-1 (Koppers-Lalic i wsp., 2001; Grabowska i wsp., 2020), jak i PRV (Grabowska i wsp., 2020),
- **MDBK** – linia ciągła komórek pochodzących z nerki bydlęcej w stadium embrionalnym, wykazujących konstytutywną produkcję cząsteczek MHC klasy II (Hughes i wsp., 1994),
- **Jurkat** – linia ciągła ludzkich limfocytów T w stadium ostrej białaczki, niewykazująca konstytutywnej ekspresji MHC II,
- **SK6** – linia ciągła spontanicznie immortalizowanych komórek nerki świńskiej, niewykazująca konstytutywnej ekspresji MHC II.

		gB HSV-1	gB BoHV-1	gB PRV
MJS		+	+	+
Jurkat*		+		
MDBK		+	+	+
SK6*				+

**RYCINA 13.** Lista linii komórek ssaczych z wprowadzonym genem *UL27* (gB) wybranych przedstawicieli alfaherpeswirusów. \* linia komórek bez endogennej ekspresji cząsteczek MHC klasy II

Linia MJS została wybrana jako wspólna (permissywna dla wszystkich badanych wirusów) linia ludzka, dla której posiadano więcej odczynników. Konstytutywna produkcja

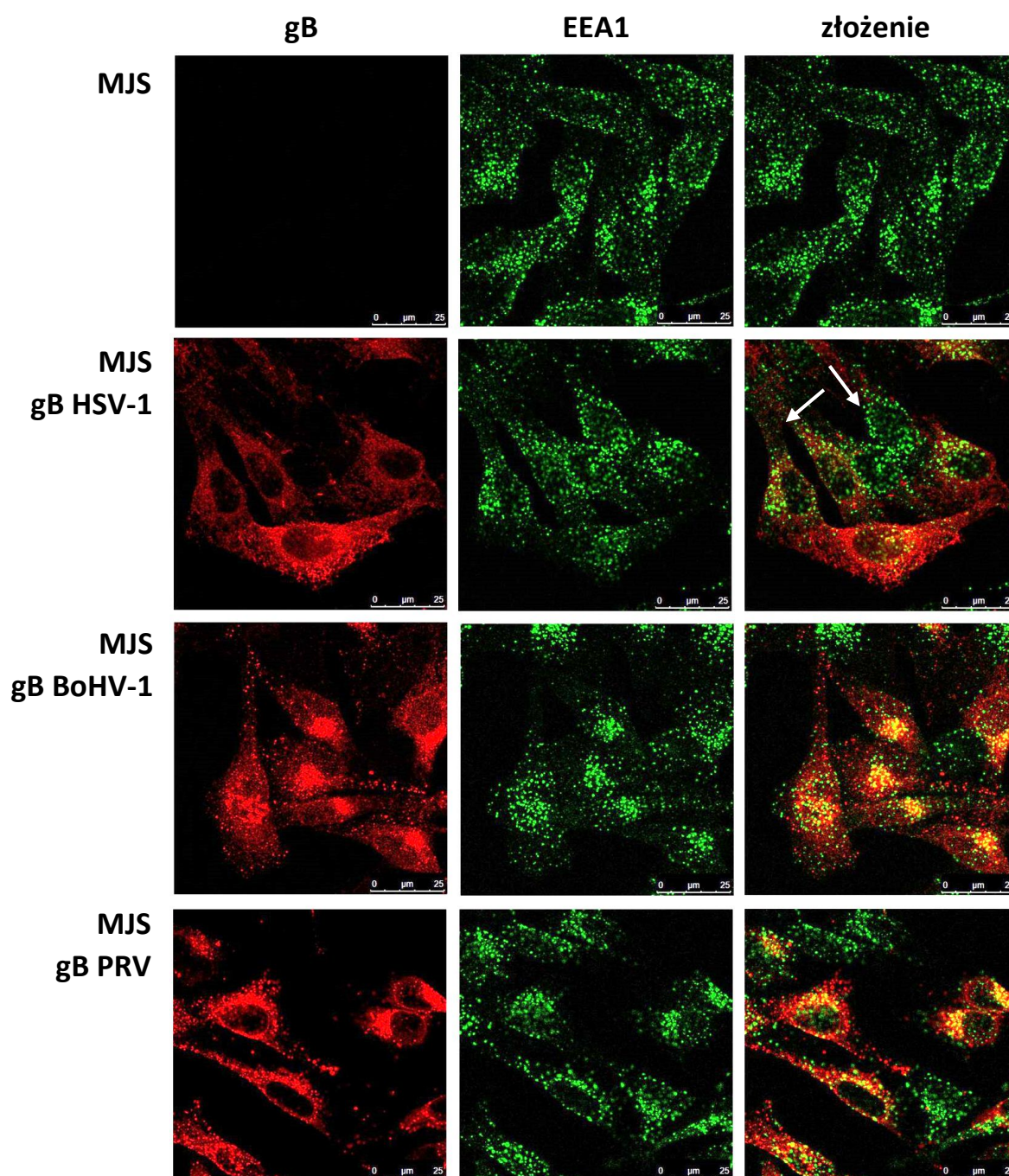


MHC II również stanowiła ważny czynnik, ponieważ zamierzano zbadać interakcje gB z tymi białkami. Uwzględnienie komórek MHC II-negatywnych w badaniu miało na celu uzyskanie informacji o potencjalnej korelacji pomiędzy obecnością i oddziaływaniem gB-MHC II z kierowaniem wirusowej glikoproteiny do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

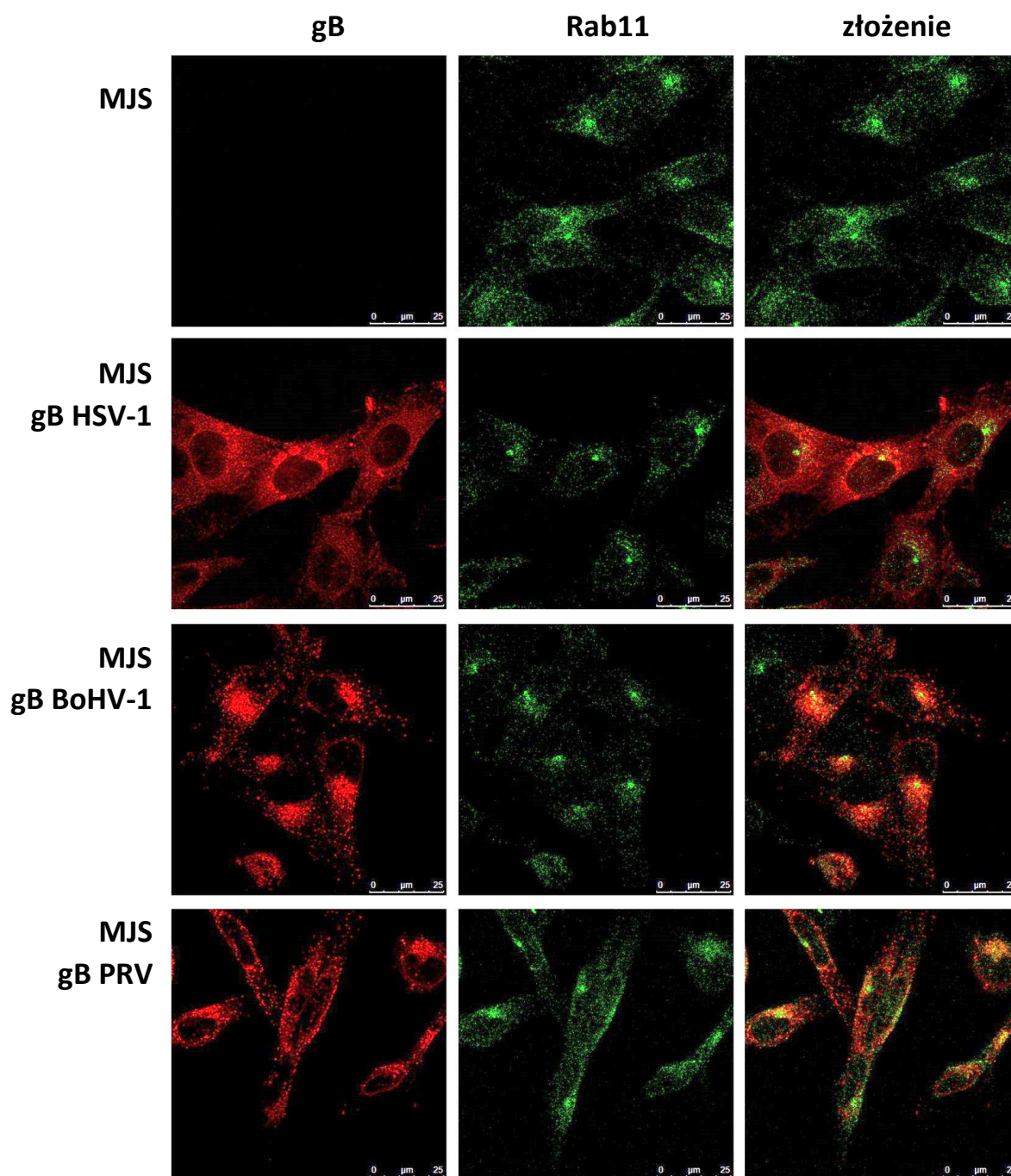
Ponadto, zostały przygotowane linie wyżej wymienionych komórek ssaczych (ze względów technicznych z wyjątkiem linii Jurkat) transdukowane przy pomocy wektorów retrowirusowych wprowadzających zamiast genu gB – gen N-acetylotransferazy puromycyny, stanowiące bardziej odpowiednie niż nietransdukowane odpowiedniki, kontrole negatywne. Te linie kontrolne zostały poddane selekcji puromycyną.

### *7.1.2 Obserwacja lokalizacji gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV na szlaku endosomalno-lizosomalnym*

W celu prześledzenia lokalizacji gB na szlaku endosomalno-lizosomalnym przeprowadzono barwienie utrwalonych komórek linii MJS produkujących gB odpowiednimi przeciwciałami i przy pomocy mikroskopii konfokalnej obserwacji lokalizacji wybranych białek. Stopień ko-lokalizacji gB z badanymi białkami na otrzymanych zdjęciach cyfrowych dodatkowo zmierzono przy pomocy oprogramowania mikroskopu konfokalnego i przedstawiono jako uśredniony współczynnik korelacji Pearsona, określający poziom zależności liniowej między zmiennymi losowymi, dla 3 zdjęć danego preparatu (razem z odchyleniem standardowym). Badanie wykazało niski stopień ko-lokalizacji gB z markerem późnych endosomów (**Rab7**) (**Rycina 16**) i lizosomalnym (**LAMP1**) (**Rycina 17**) oraz częściową ko-lokalizację w przypadku markera wczesnych (**EEA1**) (**Rycina 14**) i recyrkulujących (**Rab11**) (**Rycina 15**) endosomów, co znajduje potwierdzenie w analizie współczynnika korelacji Pearsona (**Tabela 8**). Obecność gB nie powodowała znaczących zmian w lokalizacji komórkowej poszczególnych białek markerowych. Obserwowano nieznaczne zwiększenie zgrupowań markera wczesnych endosomów w obecności gB BoHV-1 i PRV (**Rycina 14**). Badanie to uwidocznilo również występowanie struktur opisanych w literaturze jako **powiększone endosomy** (ang. *giant endosomes*) zawierające gB wirusa HSV-1 (Niazy i wsp., 2017) (**Rycina 14** – zaznaczono strzałkami).

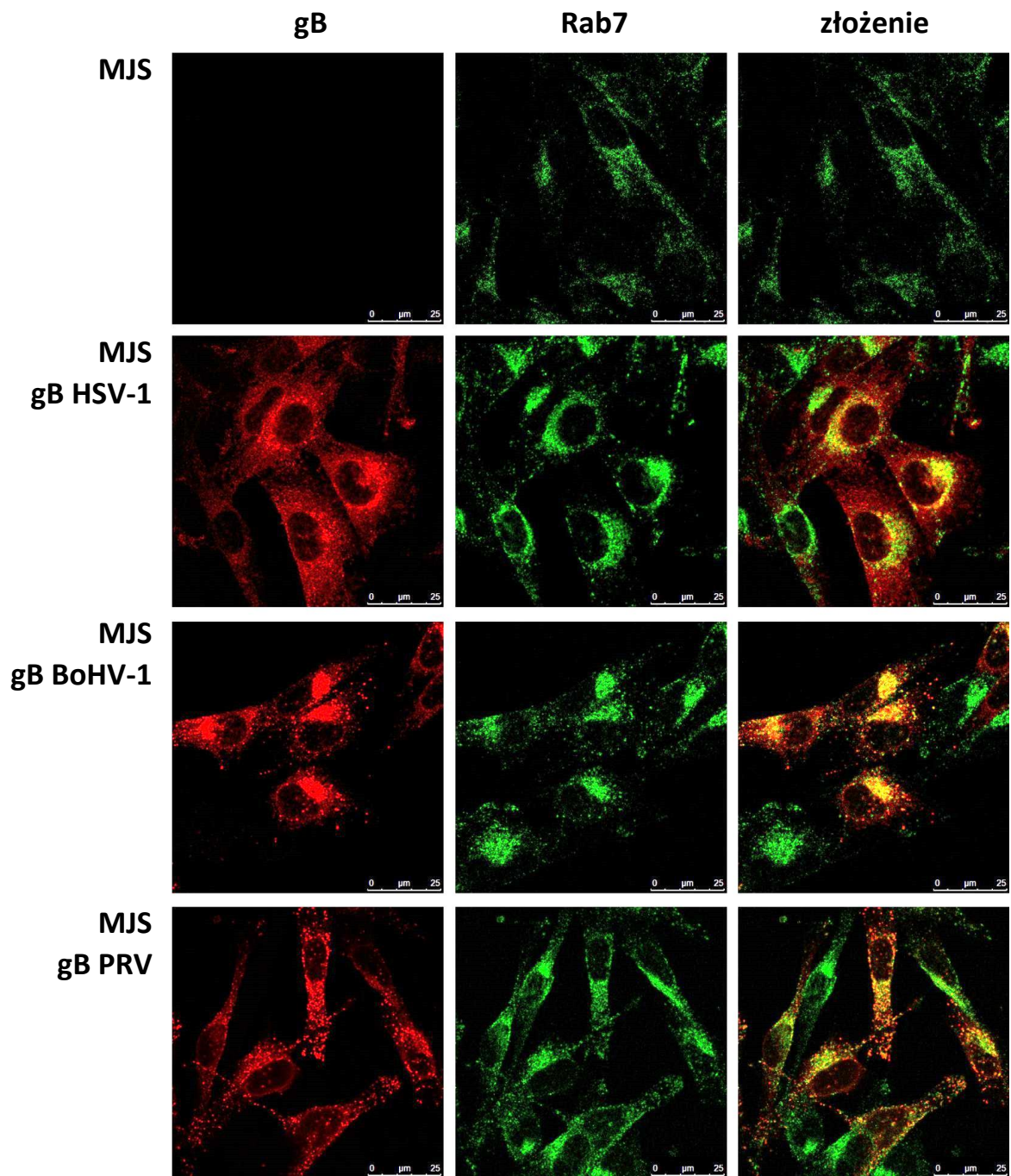


**RYCINA 14.** Badanie lokalizacji gB i białka markerowego wczesnych endosomów – EEA1, za pomocą konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej. gB wykrywano w utrwalonych i permeabilizowanych komórkach za pomocą przeciwciał anti-gB i drugorzędowych sprzężonych z znacznikiem Alexa 546 (**czerwony**). Do wizualizacji markera endosomalnego postużyły przeciwciała anti-EEA1 i drugorzędowe przeciwciała sprzężone z znacznikiem Alexa 488 (**zielony**). Strzałkami zaznaczono struktur opisanych w literaturze jako powiększone endosomy (ang. giant endosomes) występujące w komórkach zawierających gB wirusa HSV-1.

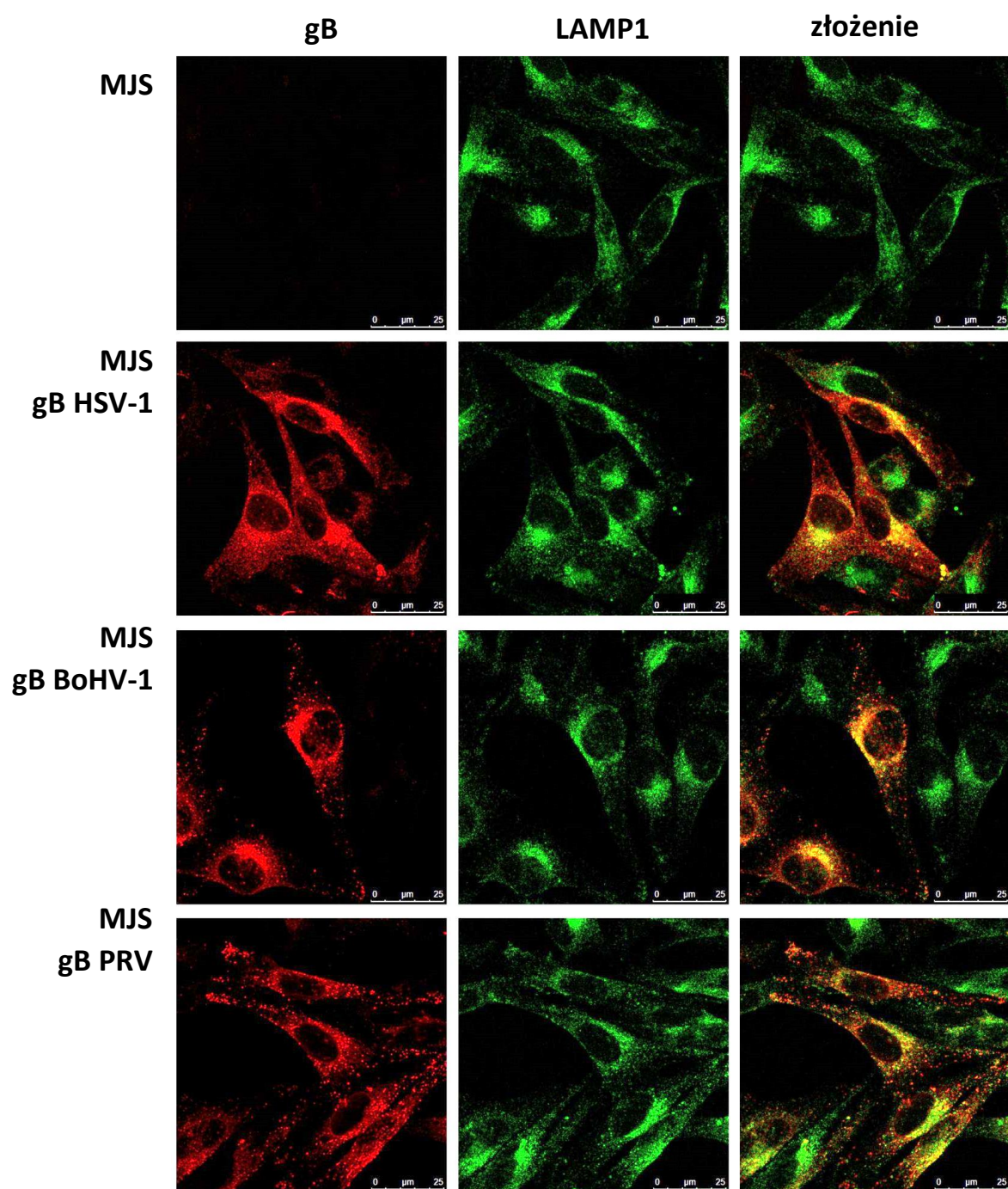


**RYCINA 15.** Badanie lokalizacji gB i białka markerowego recyrkulujących endosomów – Rab11, za pomocą konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej. gB wykrywano w utrwalonych i permeabilizowanych komórkach za pomocą przeciwciał anti-gB i drugorzędowych sprzężonych z znacznikiem Alexa 546 (**czzerwony**). Do wizualizacji markera endosomalnego posłużyły przeciwciała anti-Rab11 i drugorzędowe przeciwciała sprzężone z znacznikiem Alexa 488 (**zielony**).





**RYCINA 16.** Badanie lokalizacji gB i białka markerowego późnych endosomów – Rab7, za pomocą konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej. gB wykrywano w utrwalonych i permeabilizowanych komórkach za pomocą przeciwciał anti-gB i drugorzędowych sprzężonych z znacznikiem Alexa 546 (**czzerwony**). Do wizualizacji markera endosomalnego posłużyły przeciwciała anti-Rab7 i drugorzędowe przeciwciała sprzężone z znacznikiem Alexa 488 (**zielony**).



RYCINA 17. Badanie lokalizacji gB i białka markerowego lizosomów – LAMP1 za pomocą konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej. gB wykrywano w utrwalonych i permeabilizowanych komórkach za pomocą przeciwciał anti-gB i drugorzędowych sprzężonych z znacznikiem Alexa 546 (**czerwony**). Do wizualizacji markera lizosomalnego posłużyły przeciwciała anti-LAMP1 i drugorzędowe przeciwciała sprzężone z znacznikiem Alexa 488 (**zielony**).

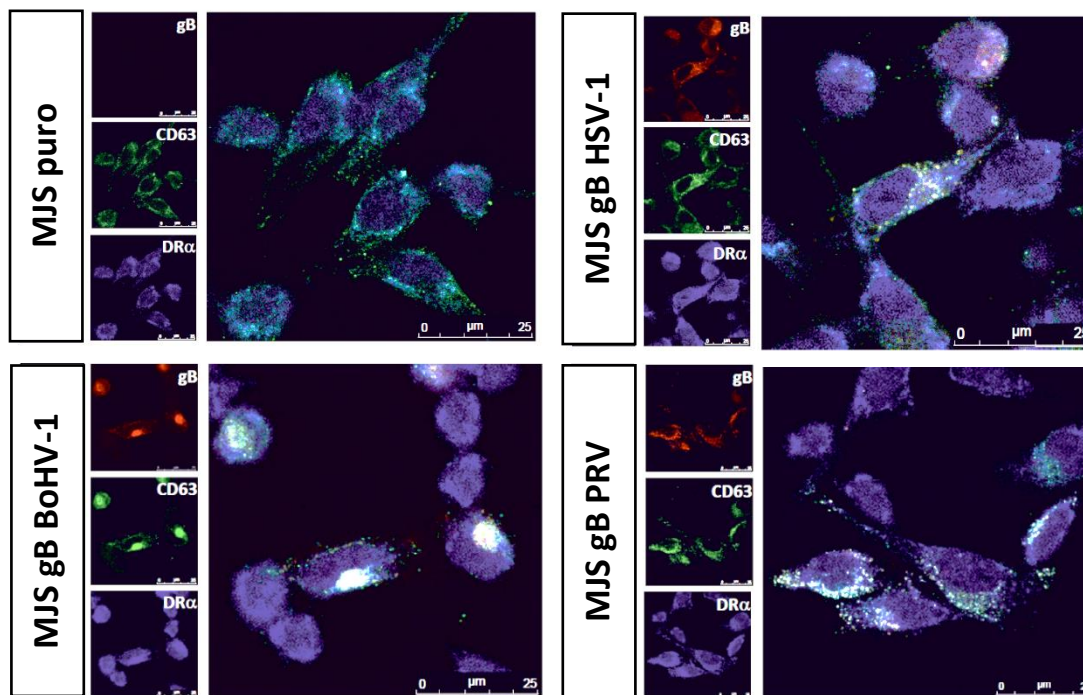
**TABELA 8. Wyznaczenie wartości współczynnika korelacji Pearsona dla porównywanych kanałów detekcji gB i EEA-1/Rab11/Rab7/LAMP-1 w liniach MJS puro, MJS gB HSV-1, MJS gB BoHV-1, MJS gB PRV. OS – odchylenie standardowe, / – nie określono. Istotność statystyczną dla różnic pomiędzy komórkami kontrolnymi a liniami z gB określono przy pomocy testu t-studenta (rozkład dwustronny z wariancją heteroscedastyczną).**

<i>linia komórkowa</i>	<i>porównywane kanały detekcji</i>	<i>średnia wartość współczynnika korelacji Pearsona ± OS</i>	<i>wartość współczynnika poziomu istotności statystycznej (p-value)</i>
MJS puro	gB/EEA1	0,04±0,00	/
MJS gB HSV-1	gB/EEA1	0,20±0,01	0,0011
MJS gB BoHV-1	gB/EEA1	0,28±0,06	0,0115
MJS gB PRV	gB/EEA1	0,32±0,11	0,0530
MJS puro	gB/Rab11	0,02±0,00	/
MJS gB HSV-1	gB/Rab11	0,30±0,03	0,0241
MJS gB BoHV-1	gB/Rab11	0,41±0,02	0,0213
MJS gB PRV	gB/Rab11	0,44±0,03	0,0365
MJS puro	gB/Rab7	-0,01±0,00	/
MJS gB HSV-1	gB/Rab7	0,46±0,06	0,0022
MJS gB BoHV-1	gB/Rab7	0,51±0,09	0,0007
MJS gB PRV	gB/Rab7	0,47±0,11	0,0022
MJS puro	gB/LAMP1	0,05±0,01	/
MJS gB HSV-1	gB/LAMP1	0,50±0,04	0,0020
MJS gB BoHV-1	gB/LAMP1	0,46±0,01	0,0000
MJS gB PRV	gB/LAMP1	0,50±0,01	0,0000



### 7.1.3 Obserwacja lokalizacji komórkowej gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV z jednoczesną wizualizacją cząsteczek MHC II oraz markera egzosomalnego CD63

W oparciu o dane literaturowe na temat interferencji komórkowej tetraspaniny **CD63** z białkami wirusowymi podczas infekcji (Fraile -Ramos i wsp., 2007; Hurwitz i wsp., 2017), ten z markerów egzosomalnych został wytypowany do badania ko-lokalizacji z gB w komórkach.



**RYCINA 18.** Immunofluorescencyjna analiza lokalizacji gB, cząsteczek MHC klasy II oraz białka markerowego egzosomów – CD63. Białka wykrywano w utrwalonych i permeabilizowanych komórkach za pomocą przeciwciał anti-gB, anti-DRα oraz anti-CD63 i drugorzędowych odpowiednio sprzężonych z znacznikiem Alexa: 546 (czerwony), 633 (niebieski), 488 (zielony).

Ponadto dowiedziono, iż CD63 wchodzi w stabilną interakcję z cząsteczkami **MHC klasy II** i kontroluje produkcję ich mRNA oraz poziom na powierzchni (van den Hoorn i wsp., 2012). Biorąc po uwagę doniesienia literaturowe dotyczące oddziaływania gB HSV-1 z cząsteczkami MHC klasy II oraz zaangażowaniu struktur MVBs w opisywane mechanizmy (Mori i wsp., 2008), przeprowadzono obserwacje komórkowej lokalizacji gB, MHC klasy II (wykrywano łańcuch  $\alpha$  ludzkich MHC II HLA-DR) i CD63 przy pomocy trójkolorowej immunofluorescencji-mikroskopii konfokalnej (**Rycina 18**). W oparciu o uzyskane zdjęcia można zaobserwować

ko-lokalizację wszystkich trzech badanych białek w skupiskach reprezentujących struktury pęcherzykowe. Co więcej, analiza wartości współczynnika korelacji Pearsona wykazała wyższy stopień ko-lokalizacji CD63-MHC II w obecności gB. Współczynnik korelacji Pearsona określono przy użyciu oprogramowania komputerowego dla 3 zdjęć danego preparatu (**Tabela 9**).

**TABELA 9.** Wyznaczenie wartości współczynnika korelacji Pearsona dla porównywanych kanałów detekcji gB/CD63/MHC II (DR $\alpha$ ) w liniach MJS puro, MJS gB HSV-1, MJS gB BoHV-1, MJS gB PRV. OS – odchylenie standardowe, / – nie określono, istotność statystyczną dla różnic pomiędzy komórkami kontrolnymi a liniami z gB określono przy pomocy testu t-studenta (rozkład dwustronny z wariacją heteroscedastyczną).

<i>linia komórkowa</i>	<i>porównywane kanały detekcji</i>	<i>średnia wartość współczynnika korelacji Pearsona <math>\pm</math> OS</i>	<i>wartość współczynnika poziomu istotności statystycznej (p-value)</i>
MJS puro	gB/CD63	0,01 $\pm$ 0,00	/
	gB/DR $\alpha$	0,01 $\pm$ 0,00	/
	CD63/ DR $\alpha$	0,64 $\pm$ 0,02	/
MJS gB HSV-1	gB/CD63	0,84 $\pm$ 0,02	0,0001
	gB/DR $\alpha$	0,64 $\pm$ 0,04	0,0014
	CD63/ DR $\alpha$	0,71 $\pm$ 0,07	0,2439
MJS gB BoHV-1	gB/CD63	0,92 $\pm$ 0,01	0,0000
	gB/DR $\alpha$	0,68 $\pm$ 0,08	0,0049
	CD63/ DR $\alpha$	0,76 $\pm$ 0,07	0,0797
MJS gB PRV	gB/CD63	0,94 $\pm$ 0,01	0,0000
	gB/DR $\alpha$	0,70 $\pm$ 0,02	0,0003
	CD63/ DR $\alpha$	0,74 $\pm$ 0,02	0,0044

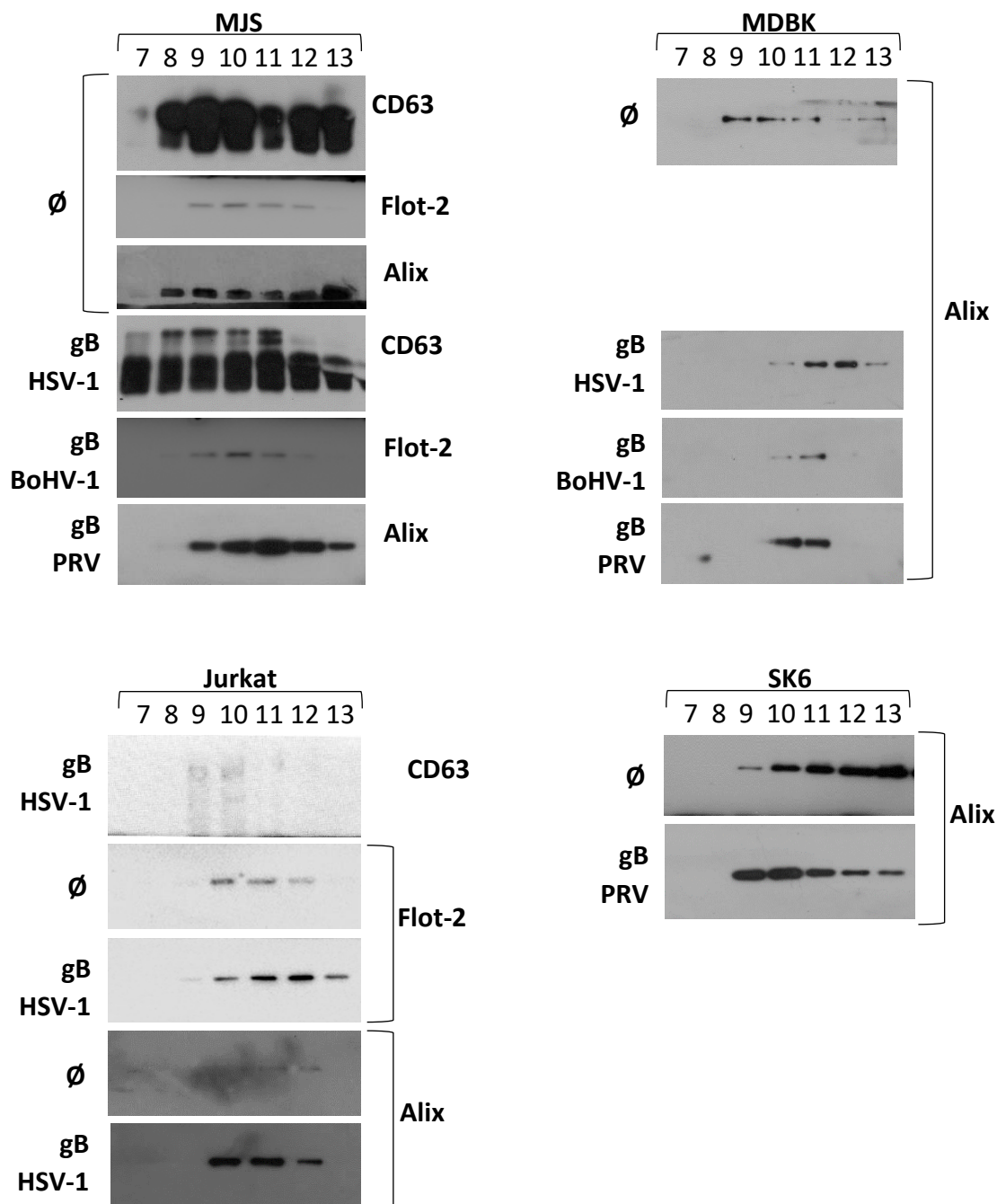


## 7.2 Konserwacja ewolucyjna mechanizmu inkorporacji homologów gB wybranych przedstawicieli alfaherpeswirusów do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i oddziaływania gB z cząsteczkami MHC II

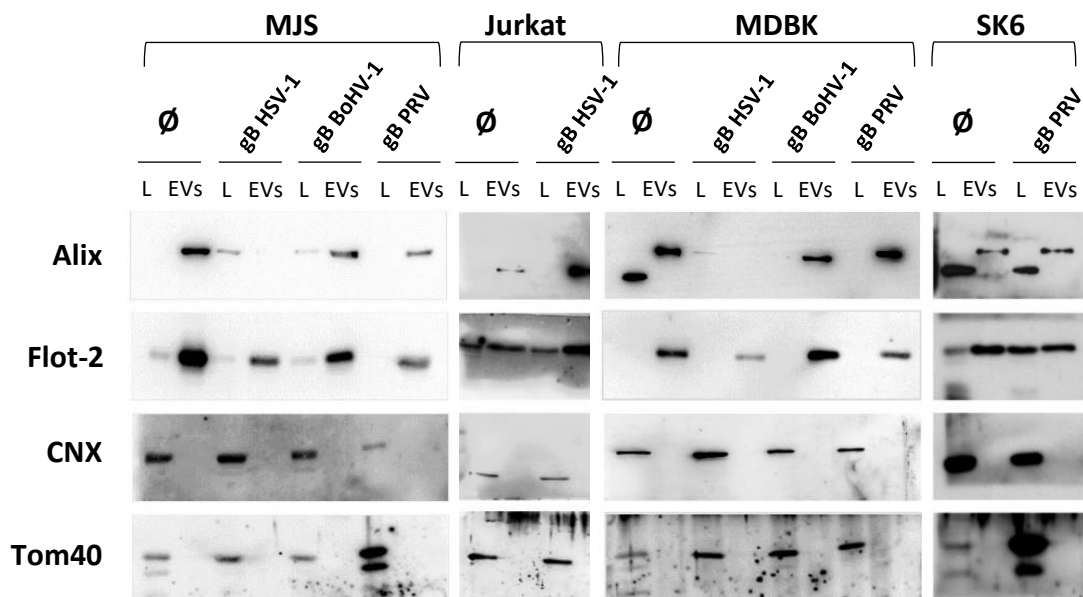
### 7.2.1 Charakterystyka fizyko-biochemiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych izolowanych z hodowli linii komórkowych z gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV

Ze względu na wysoką wydajność, powtarzalność oraz zachowaną czystość i integralność izolowanego materiału, do izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z pożywki hodowlanej przygotowanych linii stabilnych z konstytutywną ekspresją homologów genu gB wybrano filtrację żelową **SEC** (ang. *size-exclusion chromatography*). Zgodnie z zoptymalizowanym wcześniej protokołem podczas przeprowadzania procedury zbierano 25 frakcji o objętości 0,5 ml każda, które poddawano analizie Western blotting w celu detekcji markerów egzosomalych. W lizatach komórek MJS i Jurkat wykrywano **CD63** lub **flotylinę-2** i/lub **Alix**. W lizatach komórek MDBK i SK6, z powodu ograniczonej dostępności komercyjnych przeciwciał rozpoznających CD63 innych gatunków niż ludzki, wykrywano Alix. Skuteczną i efektywną izolację EVs z pożywki hodowlanej potwierdził otrzymany wynik analizy Western blotting z charakterystyczną detekcją sygnału dla białka markerowego we frakcjach **9-13** i dominującego we frakcjach **10** lub **11** (**Rycina 19**).

Te frakcje zostały połączone i w dalszym etapie poddane powtórnemu testowi na obecność markerów egzosomalych: **Alix** i **flotyliny-2** oraz komórkowych: **mitochondrialnego białka Tom40** i **kalneksyny (CNX)** występującej w retikulum endoplazmatycznym, aby wykluczyć możliwość kontaminacji materiałem pochodzenia komórkowego i potwierdzić uzyskanie frakcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (**Rycina 20**). Tom40 i CNX nie wykryto w uzyskanych preparatach EVs, co jest jednym z dowodów czystości wyizolowanych pęcherzyków. W każdym preparacie wykryto markery białkowe EVs, najczęściej w ilości większej niż w lizatach komórkowych, co jest cechą charakterystyczną markerów EVs (analizowano takie same ilości lizatów i EVs pod względem całkowitej ilości białka). W przypadku detekcji Alix w lizatach komórkowych linii MDBK i SK6 zaobserwowano dodatkowy prążek poniżej wysokości, na której migruje białko Alix, będący najprawdopodobniej rezultatem niespecyficznego wiązania przeciwciał.

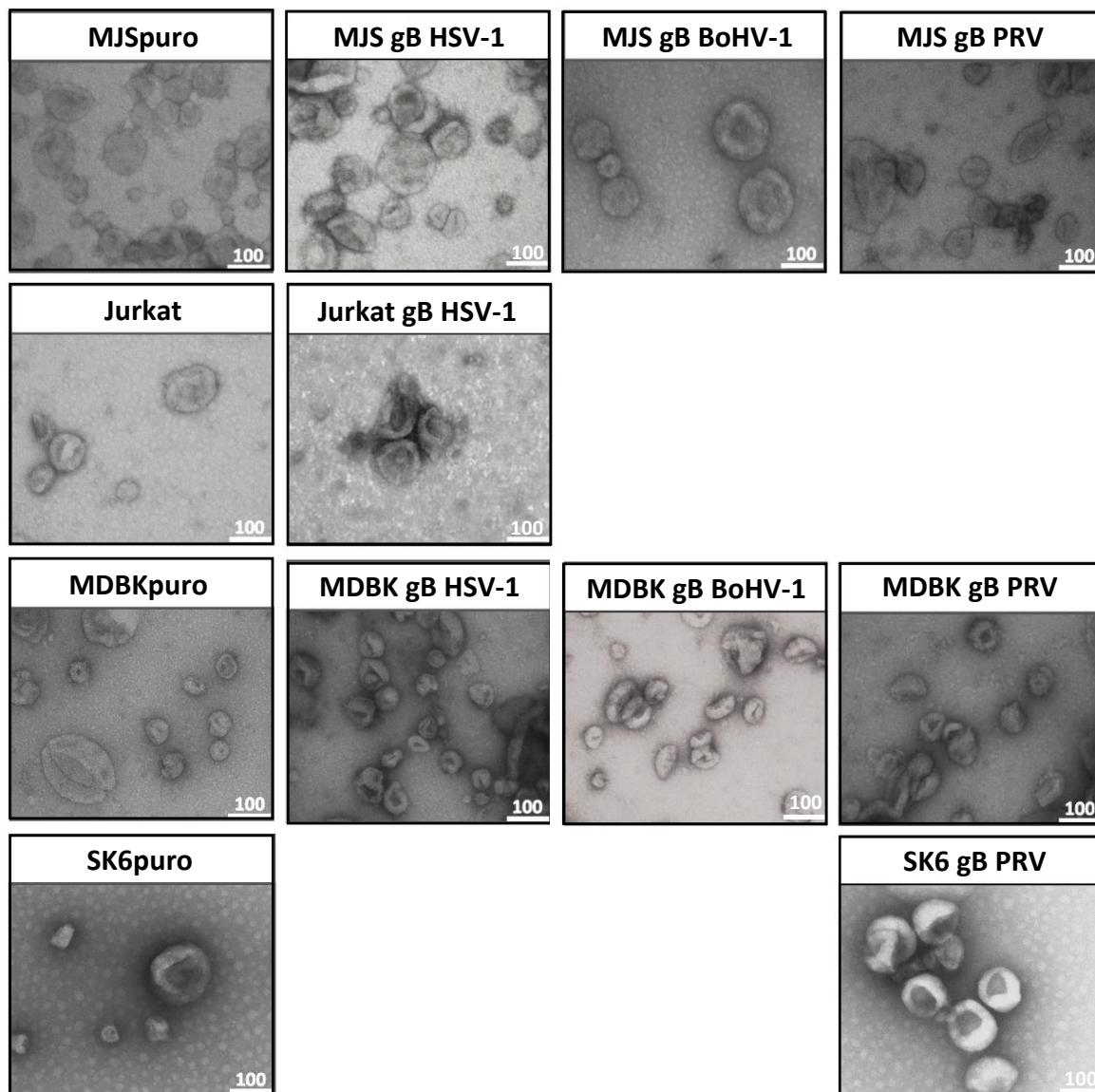


**RYCINA 19. Badanie obecności markerów EVs (CD63, Alix i flotyliny-2/Flot-2) we frakcjach EVs izolowanych metodą SEC.** EVs rozdzielano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, aby przy użyciu metody Western blotting i z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, dokonać detekcji wybranych białek. Liczby wskazują numery frakcji; Ø – EVs linii komórkowych kontrolnych.



**RYCINA 20. Badanie obecności markerów EVs (Alix i flotyliny-2/Flot-2) oraz komórkowych (Tom40 i kalneksyny/CNX) we frakcjach EVs izolowanych metodą SEC.** Lizaty komórkowe (L) lub EVs rozdzielano za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym, aby przy użyciu metody Western blotting i z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, dokonać detekcji wybranych białek. Ø – lizat komórkowy/EVs linii komórkowych kontrolnych.

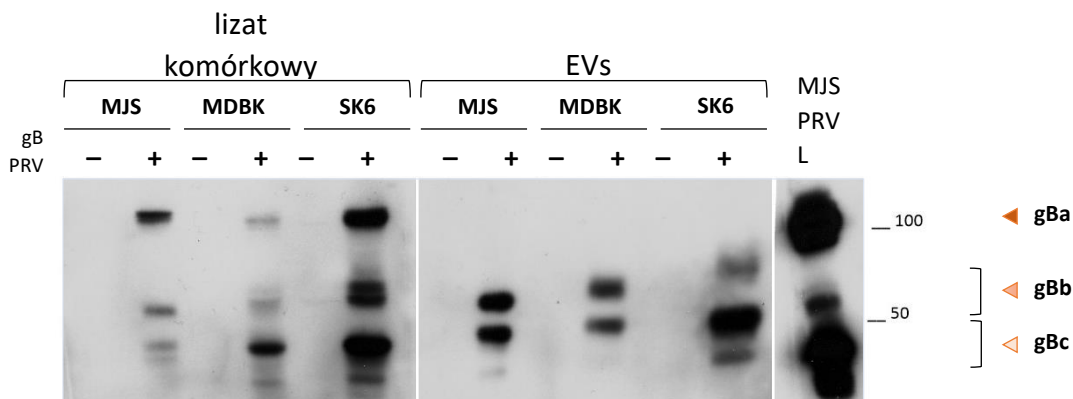
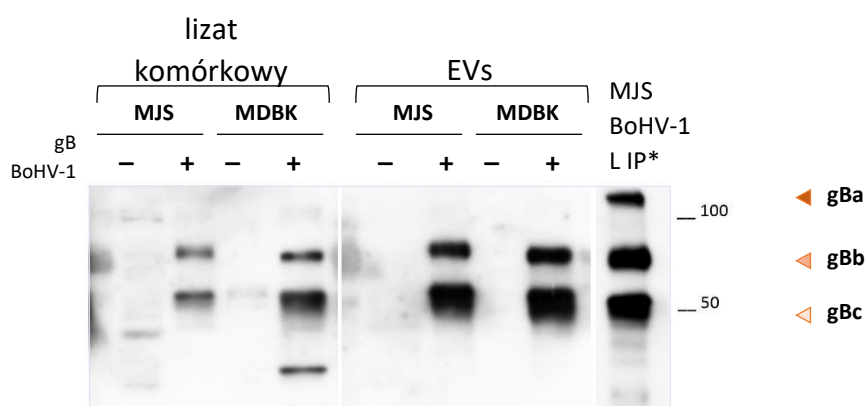
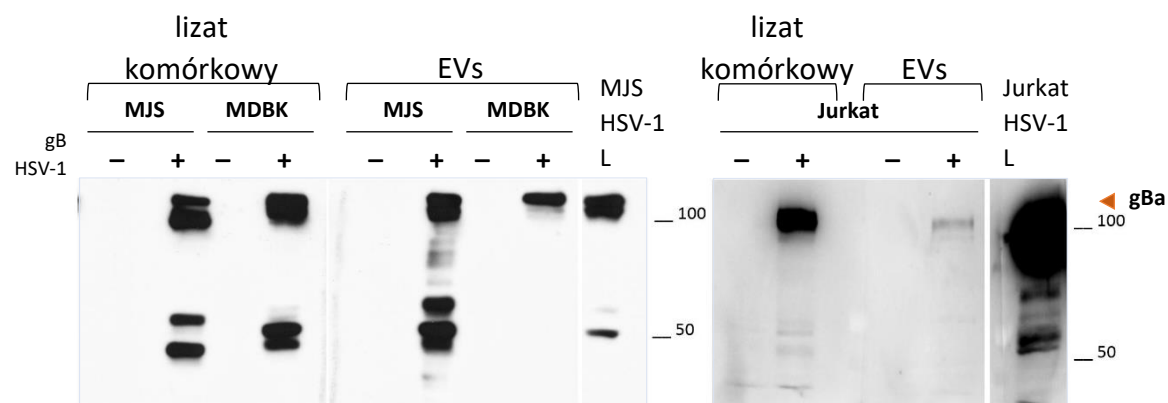
W celu uzyskania informacji na temat morfologii i średnicy izolowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, dokonano obserwacji z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego po barwieniu negatywowym octanem uranylu, uzyskując obraz przedstawiający struktury o charakterystycznym kształcie spłaszczonych (ze względu na procedurę przygotowywania materiału do obserwacji mikroskopowej) kulistych pęcherzyków o średnicy od **40** do **180** nm (**Rycina 21**). Średnicę pęcherzyków wyznaczano przy użyciu oprogramowania mikroskopu elektronowego, analizowano 100 pęcherzyków dla każdego preparatu. Nie zaobserwowano znaczących różnic w populacjach pęcherzyków dla poszczególnych preparatów.



**RYCINA 21. Obserwacja EVs izolowanych z pożywki hodowlanej otrzymanych linii komórkowych z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego po barwieniu negatywowym octanem uranylu. Przedstawiono reprezentatywne obrazy dla poszczególnych linii komórkowych, pasek skali 100 nm.**

### 7.2.2 *Badanie inkorporacji gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych*

Jak dotąd, potwierdzono występowanie glikoproteiny B wirusa HSV-1 w MVBs i pęcherzykach komórkowych izolowanych z transfekowanych lub stabilnych linii komórek ssaczych (Temme i wsp., 2010). W celu określenia stopnia konserwacji ewolucyjnej mechanizmu inkorporacji gB do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, zdecydowano się poddać analizie pęcherzyki z linii komórek z gB pozostałych przedstawicieli alfaherpeswirusów. gB, licząca odpowiednio 904, 933 i 913 reszt aminokwasów, odpowiednio dla wirusa HSV-1, BoHV-1 i PRV, będąca białkiem błonowym typu pierwszego, występuje w formie prekursorowej (**gBa**), migrującej w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących na wysokości odpowiadającej masie 110-130 kDa. W przypadku wirusów BoHV-1 i PRV następuje dodatkowa modyfikacja – cięcie proteolityczne furyną w pozycji 502/504, skutkująca podziałem gB na dwie podjednostki: N-terminalną – **gBb** (74/68 kDa) i C-terminalną przezbłonową – **gBc** (55 kDa), połączone mostkami disiarczkowymi. gB wirusa HSV-1 nie podlega takiej modyfikacji. W przeprowadzonym badaniu potwierdzono obecność gB zarówno w lizatach komórkowych, jak i w EVs izolowanych z pożywki hodowlanej linii gB HSV-1-pozytywnych, jednakże w przypadku linii Jurkat, która nie posiada cząsteczek MHC klasy II, na znacznie niższym poziomie w stosunku do linii MJS i MDBK. Dodatkowo, możliwa była detekcja w lizatach komórkowych i EVs linii MJS-gB HSV-1 podwójnego prążka gB na wysokości 110-120 kDa. Wskazywać może to na występowanie dwóch form gB, wynikające prawdopodobnie z występowania gB zarówno w wersji dojrzałej glikoproteiny oraz posiadającej zróżnicowany wzór N-glikozylacji (Wenske i wsp., 1982). Podobne formy o niższej masie cząsteczkowej zostały także wykryte i opisane podczas badań z wykorzystaniem komórek transfekowanych (Atanasiu i wsp., 2007). Pomimo detekcji formy prekursorowej gB BoHV-1 i PRV oraz obu podjednostek powstałych w wyniku cięcia proteolitycznego w lizatach komórkowych uzyskanych linii komórkowych, tylko formy gBb i gBc były wykrywane w EVs. Ponadto, obserwowana masa cząsteczkowa poszczególnych homologów gB różniła się w zależności od rodzaju linii komórkowej, w której była produkowana, co może się wiązać z odmiennym wzorem glikozylacji w różnych komórkach ssaczych (**Rycina 22**).

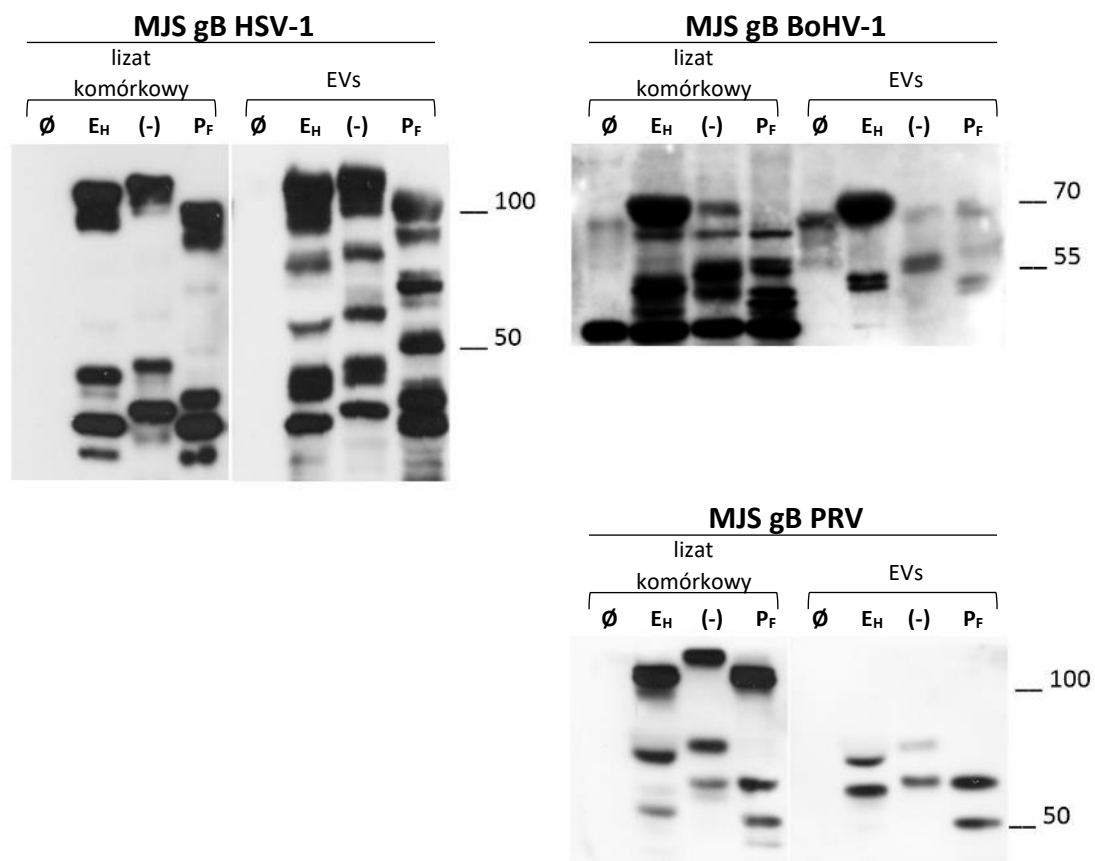


**RYCINA 22. Detekcja gB w lizatach komórkowych i frakcjach EVs izolowanych metodą SEC.** Lizaty komórkowe lub EVs rozdzielano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, aby przy użyciu metody Western blotting i z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, dokonać detekcji białka gB. Kontrole negatywne lizatów komórkowych i EVs uzyskano odpowiednio z komórek MJSpuro, MDBKpuro, SK6puro, Jurkat. Kontrole pozytywne lizatów komórkowych uzyskano z komórek MJS infekowanych wirusem HSV-1, BoHV-1 lub PRV oraz z komórek Jurkat infekowanych wirusem HSV-1. MJS BoHV-1 L IP\* – materiał uzyskany poprzez precypitację z użyciem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko gB BoHV-1 i złoża agarozą-białko A. Jednostka masy cząsteczkowej kDa.

### 7.2.3 Analiza wzoru glikozylacji glikoproteiny B wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV w otrzymanych liniach stabilnych MJS i preparatach pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Zaobserwowane różnice w masach cząsteczkowych gB z różnych komórek stały się punktem wyjścia do analizy stopnia i rodzaju glikozylacji wirusowej glikoproteiny poprzez trawienie **endoglikozydazą H** (EndoH) i **peptydylo-N-glikozydazą F** (PNGaza F). EndoH (endo-beta-N-acetyloglukozaminidaza A), będąca specyficznym enzymem dla glikoprotein, oddziela wiązanie w rdzeniu diacetylochitobiozowym oligosacharydu pomiędzy dwiema podjednostkami N-acetyloglukozaminy (GlcNAc) bezpośrednio w pobliżu reszty asparaginy, tworząc skróconą cząsteczkę cukru z jedną resztą N-acetyloglukozaminy pozostającą na asparaginie. Traktowanie PNGazą F natomiast, poprzez jej zdolność do trawienia enzymatycznego między najbardziej wewnętrznymi resztami N-acetyloglukozaminy i asparaginy N-glikozylowanych glikoprotein, pozwala na całkowite rozdzielanie białka i przyłączonych N-glikanów. W ten sposób można rozróżnić poziom glikozylacji danej glikoproteiny wskazujący na jej prekursorową lub dojrzałą formę i uzyskać informację o statusie przejścia przez retikulum endoplazmatyczne i/lub część *trans* aparatu Golgiego, w których zachodzi proces N-glikozylacji. Analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowej gB, przewidująca występowanie motywów predestynujących do wprowadzania modyfikacji posttranslacyjnych ([https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif\\_scan](https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif_scan)) wskazała na lokalizację sześciu potencjalnych miejsc N-glikozylacji w przypadku wirusa BoHV-1 i PRV oraz siedmiu dla wirusa HSV-1. Nie jest wiadome, ile z tych miejsc ulega modyfikacji w rzeczywistości. Wynik przeprowadzonej analizy Western blotting, poprzedzonej reakcją trawienia enzymatycznego EndoH i PNGazą F, potwierdził obecność form gBa, gBb i gBc ulegających modyfikacjom enzymatycznym wykorzystanymi w doświadczeniu endoglikozydazami. W lizatach komórkowych i preparatach EVs linii MJS-gB HSV-1 i MJS-gB PRV poszczególne formy białka posiadały mniejszą masę cząsteczkową w porównaniu z materiałem kontrolnym, niepoddanym działaniu enzymów. W przypadku trawienia EndoH obserwowano spadek masy cząsteczkowej, ale nie taki sam jak w przypadku traktowania próbki PNGazą F, co prawdopodobnie wynika z faktu, że w jednej cząsteczce białka nie wszystkie miejsca glikozylacji otrzymują pełnej długości łańcuchy N-glikanów.

Analogiczna analiza wykonana dla linii MJS-gB BoHV-1 wykazała zależność spadku masy tylko w przypadku formy gBc, co sugeruje niepełną glikozylację w przeciwieństwie do formy gBb, dla której przy trawieniu EndoH nie odnotowuje się spadku masy, co sugeruje, że ta podjednostka jest w pełni glikozylowana. Wzmocnienie sygnału dla formy gBb BoHV-1, można tłumaczyć zwiększoną dostępnością epitopów dla przeciwciał wiążących gB po modyfikacji enzymatycznej, a detekcja dodatkowych prążków wynika z użycia w tym eksperymencie surowicy poliklonalnej, a przez to niespecyficznego wiązania przeciwciał. Powyższe obserwacje pozwalają na wnioskowanie o występowaniu w EVs form gB N-glikozylowanych (**Rycina 23**).



**RYCINA 23. Analiza dojrzewania gB obecnej w komórkach i preparatach EVs otrzymanych linii komórkowych MJS gB HSV-1, MJS gB BoHV-1 i MJS gB PRV.** Lizaty komórkowe lub EVs inkubowano z endoglikozydazami: EndoH (E<sub>H</sub>), PNGaząF (P<sub>F</sub>) lub inkubowano w buforze dla PNGazy bez enzymów (-). Następnie uzyskany materiał rozdzielono za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, aby przy użyciu metody Western blotting i z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, dokonać detekcji białka gB. Lizat kontrolny (∅) uzyskano z komórek MJSpuro. Jednostka masy cząsteczkowej kDa.

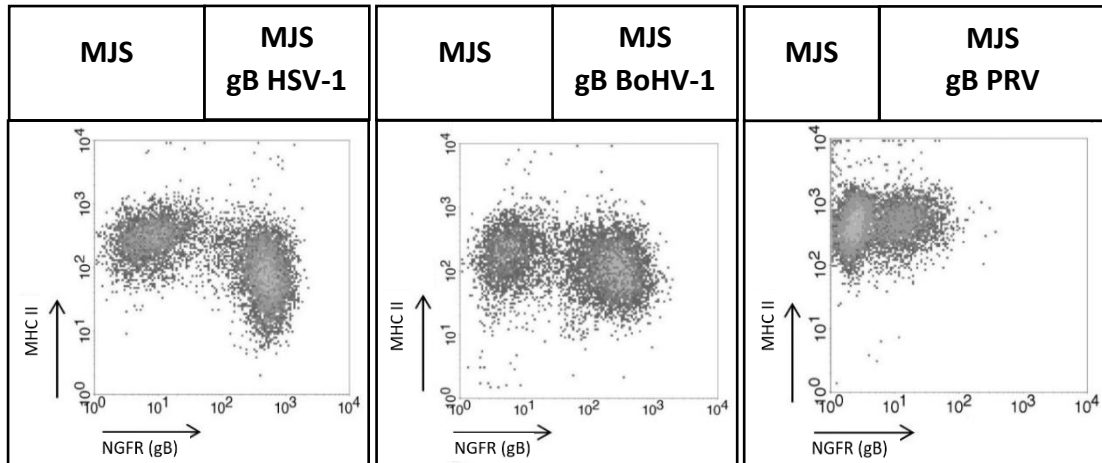


#### *7.2.4 Badanie interakcji pomiędzy gB wirusów HSV-1, BoHV-1 lub PRV i cząsteczkami MHC II oraz jej wpływu na poziom cząsteczek MHC II na powierzchni komórki*

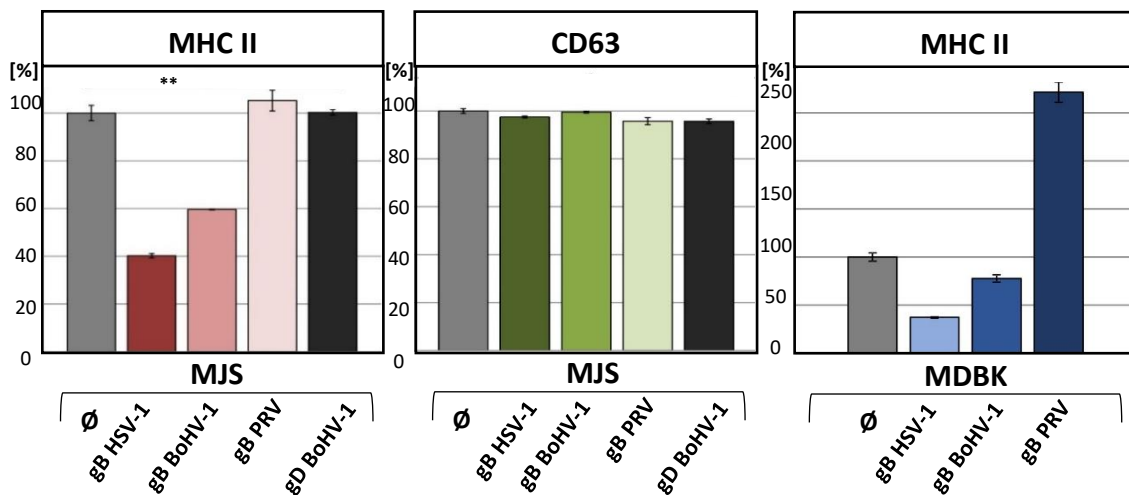
Ze względu na opublikowane dane o obniżonym poziomie cząsteczek MHC klasy II na powierzchni komórek ssaczy w obecności gB HSV-1 oraz wzajemnym oddziaływaniu wymienionych białek (Neumann i wsp., 2003), przeprowadzono analizę poziomu MHC klasy II na komórkach MJS gB BoHV-1 i gB PRV, jednocześnie sprawdzając stopień konserwacji ewolucyjnej opisywanych mechanizmów. Komórki linii stabilnych po transdukcji retrowirusem, ale przed sortowaniem na występowanie białka markerowego NGFR, którego obecność powinna korelować z obecnością gB, barwiono na powierzchni jednocześnie przeciwciałami anti-NGFR i anti-MHC II (HLA-DR). W analizie za pomocą cytometrii przepływowej zaobserwowano dwie populacje komórek: NGFR-pozytywnych i NGFR-negatywnych, które powinny odpowiadać komórkom gB-pozytywnym i gB-negatywnym (**Rycina 24 A**). Porównano poziom MHC II pomiędzy tymi dwiema populacjami. Analiza wskazała na znaczące obniżenie poziomu MHC klasy II (badanego przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko kompleksowi HLA-DR z peptydem) w populacji NGFR-pozytywnej linii MJS gB HSV-1 oraz, w mniejszym stopniu, analogiczną różnicę dla MJS gB BoHV-1. Poziom MHC II w obecności gB PRV w komórkach MJS był taki sam, jak w komórkach gB-negatywnych, co może sugerować brak wpływu gB PRV na poziom powierzchniowy cząsteczek MHC klasy II w tej linii komórkowej. W celu dokonania ilościowego pomiaru zmian opisywanej zależności przeanalizowano średnie intensywności fluorescencji MHC II w sortowanych liniach komórkowych MJS (**Rycina 24 B**). Poza komórkami MJSpuo dodatkową kontrolę stanowiły komórki MJS ze stabilną ekspresją genu osłonkowej glikoproteiny D (gD) wirusa BoHV-1. Zaobserwowano wspólną właściwość obniżonego poziomu MHC II w obecności gB wirusów HSV-1 i BoHV-1, o odpowiednio 60% i 40% w porównaniu do komórek kontrolnych MJSpuo. Również w tym przypadku nie odnotowano znaczących zmian dla linii MJS gB PRV. Zbadano także wpływ gB na powierzchniowy poziom białka CD63 w presortowanych komórkach (**Rycina 24 B**). Pomimo obserwowanej ko-lokalizacji gB-MHC II-CD63, powierzchniowa ekspresja tej tetraspaniny nie różniła się w sposób istotny pomiędzy badanymi liniami komórkowymi. Oznaczenie poziomu MHC klasy II w bydlęcych liniach komórkowych MDBK wykazało podobny wpływ obecności gB: najsilniejszy efekt gB HSV-1

i pośredni w przypadku gB BoHV-1, natomiast wzrost poziomu MHC II przy obecności gB PRV w bydłych komórkach.

**A**



**B**



**RYCINA 24. Porównanie poziomu cząsteczek MHC klasy II i CD63 na powierzchni komórek z konstytutywną ekspresją genu gB.** A – Powierzchniową obecność HLA-DR badano za pomocą cytometrii przepływowej na niesortowanych komórkach MJS transdukowanych retrowirusem niosącym gen gB (wykorzystując występowanie powierzchniowego białka markerowego, skróconej wersji nerwowego receptora czynnika wzrostu – NGFR – odzwierciedlającego poziom gB względem MHC II). B – Analiza porównawcza poziomów MHC II na powierzchni sortowanych komórek wykazujących ekspresję gB. Ekspresję powierzchniowego CD63 analizowano jako kontrolę. Dla porównania oceniono wpływ gD kodowanego przez BoHV-1 na powierzchniowe MHC II i CD63. Średnią intensywność fluorescencji MHC II / CD63 na komórkach kontrolnych MJSpuro ustalono jako 100%. Powierzchniowe MHC II analizowano metodą cytometrii przepływowej na sortowanych komórkach MDBK transdukowanych retrowirusem gB i komórkach kontrolnych MDBKpuro. Średnią intensywność fluorescencji MHC II na komórkach kontrolnych MDBKpuro ustalono jako 100%. Analizę przeprowadzono trzykrotnie. Istotność statystyczną różnic między liniami komórkowymi MJSpuro i MJS gB/gD oraz MDBKpuro i MDBK gB oszacowano za pomocą testu t-studenta (rozkład dwustronny z wariancją heteroscedastyczną); \*\* p≤0,001.

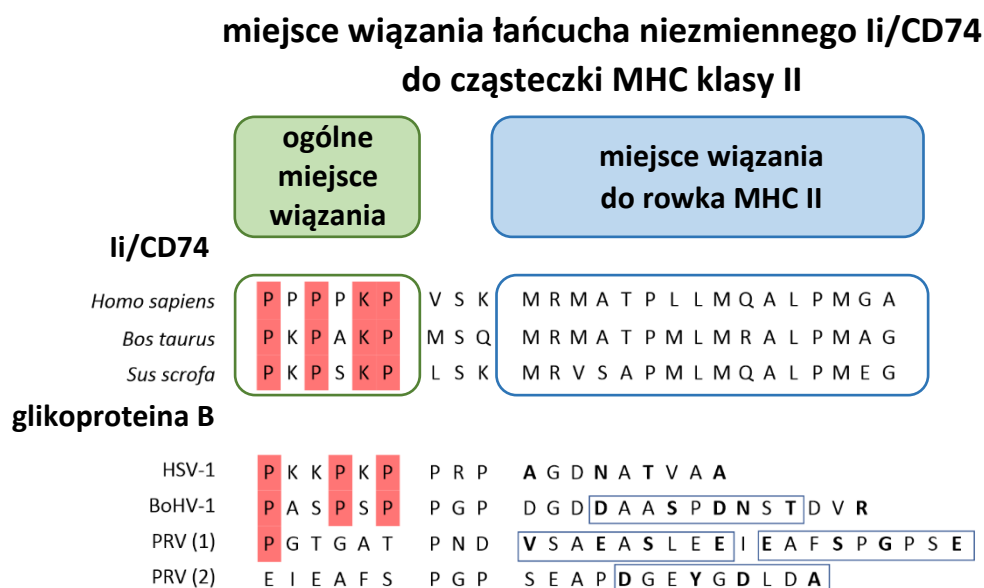
### *7.2.5 Analiza oddziaływania MHC II-glikoproteina B oraz porównanie podobieństwa sekwencji aminokwasowej glikoproteiny B wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV oraz niezmiennego łańcucha związanego z antygenami głównego układu zgodności tkankowej klasy II*

Wykazany wcześniej wpływ gB HSV-1 na obniżanie poziomu cząsteczek MHC klasy II zachodzi poprzez bezpośrednie oddziaływanie obu białek, a dokładniej przez interakcję MHC II z krótkim fragmentem gB posiadającym homologiczną sekwencję aminokwasową do tej zlokalizowanej w łańcuchu polipeptydowym białka Ii/CD74.

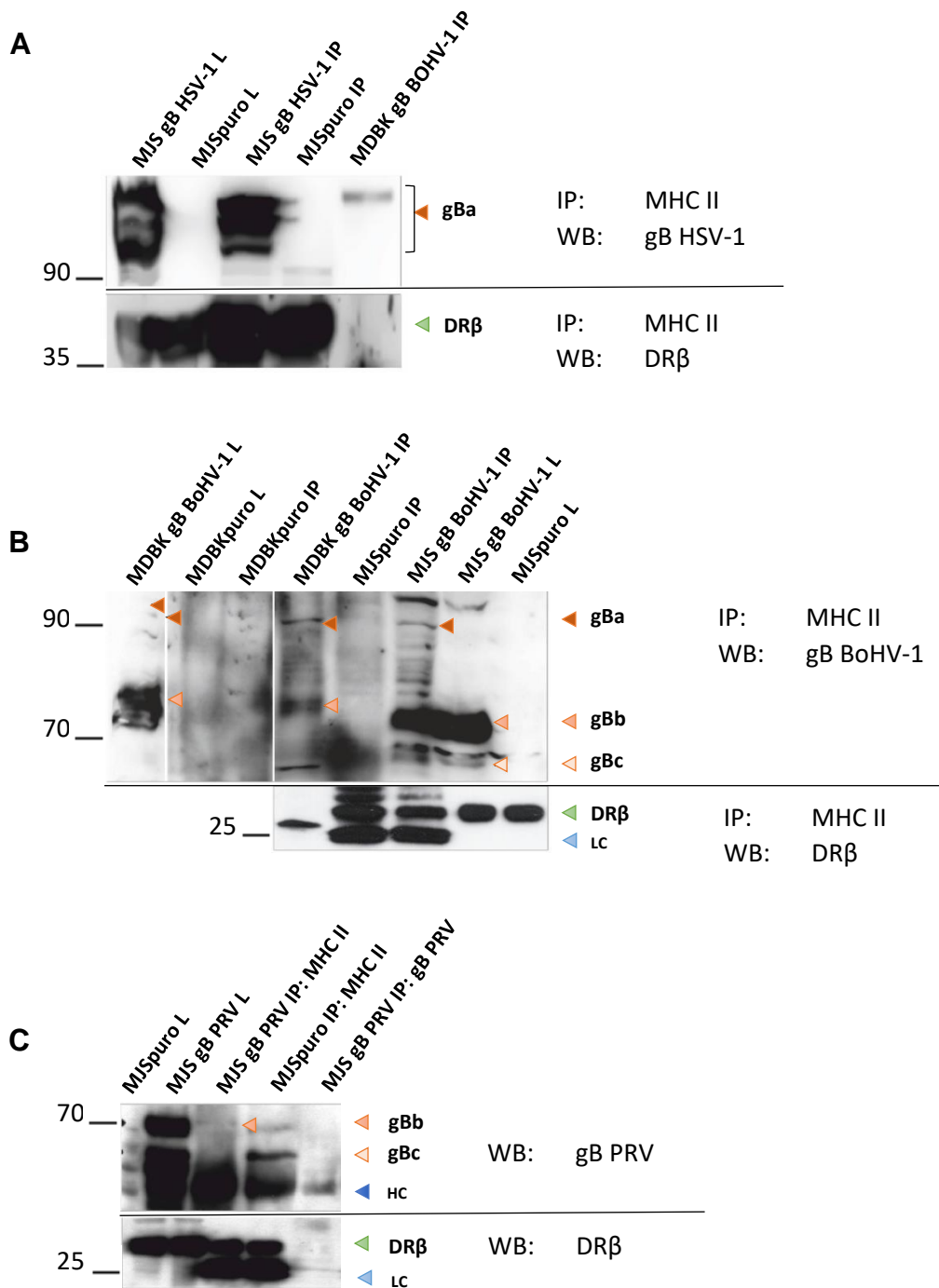
W warunkach fizjologicznych Ii/CD74 – łańcuch niezmienny związany z antygenami – bierze udział w zabezpieczeniu przed niespecyficznym wiązaniem antygenów endogennych do rowka cząsteczki MHC II. Mechanizm przyłączania Ii/CD74 do MHC II zachodzi w szorstkim retikulum endoplazmatycznym, poprzez oddziaływanie segmentów: wiążącego rowek MHC II i ogólnego miejsca wiązania zlokalizowanych na Ii/CD74. łańcuch niezmienny, ze względu na występowanie w jego ogonie cytoplazmatycznym motywów sygnałowych sortowania endosomalnego, ułatwia również eksport MHC II z retikulum endoplazmatycznego do późnego endosomalnego przedziału ładunkowego MHC II (kompartementu MHC II/ MIIC), gdzie zachodzi przyłączanie peptydu antygenowego prezentowanego następnie na powierzchni komórki (Schröder, 2016).

Porównanie sekwencji aminokwasowej trzech wariantów Ii/CD74 (ludzkiego, bydlęcego, świńskiego) i czterech wariantów gB (HSV-1, BoHV-1, dwa szczepy PRV) wykonane przy użyciu programu T-Coffee pozwoliło na zaobserwowanie, iż segment Ii/CD74, zawierający sekwencję ogólnego miejsca wiązania do MHC II, wykazuje podobieństwo do fragmentu sekwencji gB HSV-1; jest to jednak jeden z najmniej konserwowanych regionów w sekwencji aminokwasowej gB, różniący się znacznie w przypadku wirusa BoHV-1 oraz PRV. Bydłęce i świńskie sekwencje Ii/CD74 są silnie konserwowane, ale odpowiadające im regiony w gB BoHV-1 i PRV są zmienne. W gB BoHV-1 podobieństwo jest zachowane poprzez obecność reszt prolinowych, natomiast sekwencja gB PRV różni się także w znaczący sposób pomiędzy różnymi szczepami tego wirusa (**Rycina 25**).

Aby zweryfikować oddziaływanie i/ lub zdolność wiązania gB do cząsteczek MHC klasy II przeprowadzono eksperyment immunoprecypitacji kompleksów gB-MHC II w lizatach komórkowych (**Rycina 26**). Do lizatów komórkowych (kontrolnych lub pozyskanych z linii gB-pozytywnej) dodano przeciwciała anti-MHC II i białko A związane ze złożem agarozowym, immunoprecypitaty rozdzielano metodą SDS-PAGE i analizowano w nich metodą Western blotting możliwość detekcji gB lub kontrolnie łańcucha  $\beta$  HLA-DR (w lizatach komórek MDBK nie było możliwe uwidocznienie bydlęcych MHC II z powodu braku dostępnych przeciwciał reagujących w technice Western blotting). Analogiczna analiza nie została wykonana dla wariantu gB wirusa PRV w komórkach gatunkowo specyficznych ze względu na brak dostępności świńskiej linii komórkowej z endogenną ekspresją MHC II.



**RYCINA 25. Porównanie sekwencji aminokwasowej potencjalnych miejsc wiązania gB HSV-1, BoHV-1 oraz dwóch różnych szczepów PRV: NIA3 (1) i Kaplan (2) do cząsteczki MHC klasy II.** Reszty aminokwasów w sekwencji gB identyczne z obecnymi w sekwencji ogólnego miejsca wiązania Ii/CD74 zaznaczono na czerwonym tle. Prostokątne ramki podkreślają przewidywane miejsca wiązania MHC II, a oznaczenia aminokwasów potencjalnie biorących udział w wiązaniu do rowka MHC II oznaczono pogrubionym drukiem.

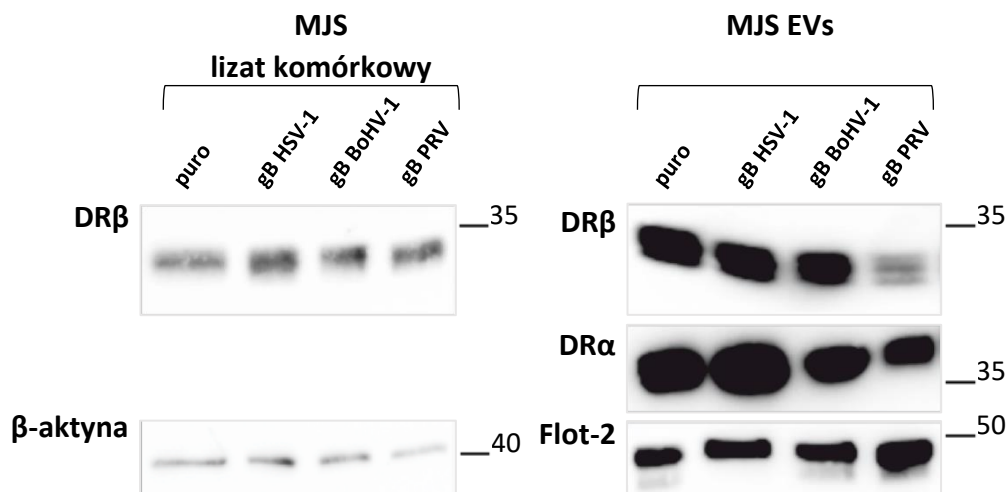


**RYCINA 26. Analiza interakcji między cząsteczkami MHC klasy II i gB HSV-1 (A), gB BoHV-1 (B) lub gB PRV (C).** Tworzenie kompleksu między gB i MHC II z lizatów komórkowych (L) oceniano poprzez immunoprecypitację (IP) z wykorzystaniem przeciwciał, odpowiednio anty-gB lub anty-MHC II. Immunoprecypitowane białka (IP) rozdzielano za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym, aby przy użyciu metody Western blotting (WB) i z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, dokonać detekcji białka gB lub MHC II (DRβ). Jednostka masy cząsteczkowej kDa. LC – łańcuch lekki przeciwciała, HC – łańcuch ciężki przeciwciała.

Analiza Western blotting immunoprecypitatów pozwoliła na detekcję obecności zarówno immunoprecypitowanego MHC II (lizaty MJS), jak i ko-precypitującego gB HSV-1 (**Rycina 26 A**), wskazując na tworzenie kompleksów przez oba białka. Ko-precypitujące gB HSV-1 wykryto również w mniejszej ilości w immunoprecypitatach otrzymanych z lizatów komórek MDBK z konstytutywną produkcją gB HSV-1, pomimo braku możliwości detekcji bydłących MHC II (do immunoprecypitacji wykorzystano konformacyjne przeciwciała IL-A21, które nie reagują ze zdenaturowanymi białkami). W przypadku gB BoHV-1 (lizaty MDBK i MJS), w kompleksach immunoprecypitowanych przeciwciałami anty-MHC II była możliwa detekcja przede wszystkim formy gBb (w mniejszej ilości gBc); do detekcji wykorzystano mieszaninę przeciwciał monoklonalnych, które najlepiej uwidaczniają formę gBb (**Rycina 26 B**). W przypadku wirusa PRV (lizaty MJS) nie wykazano w sposób jednoznaczny interakcji gB-ludzkie MHC II (**Rycina 26 C**).

W dalszym etapie, metodą Western blotting, dokonano oceny występowania cząsteczek MHC klasy II w EVs izolowanych z linii komórkowych MJS. Potwierdzono występowanie podjednostki DR $\alpha$  i DR $\beta$  w EVs z gB wszystkich badanych alfaherpeswirusów. Najsilniejszy sygnał detekcji dla DR $\alpha$  odnotowano w przypadku gB HSV-1. Obecność gB BoHV-1 nie zmieniała ilości wykrywanych białek w porównaniu z komórkami gB-negatywnymi, obserwowano natomiast znacznie niższy sygnał detekcji dla podjednostki DR $\beta$  w EVs pochodzących z linii MJS gB PRV (**Rycina 27**).

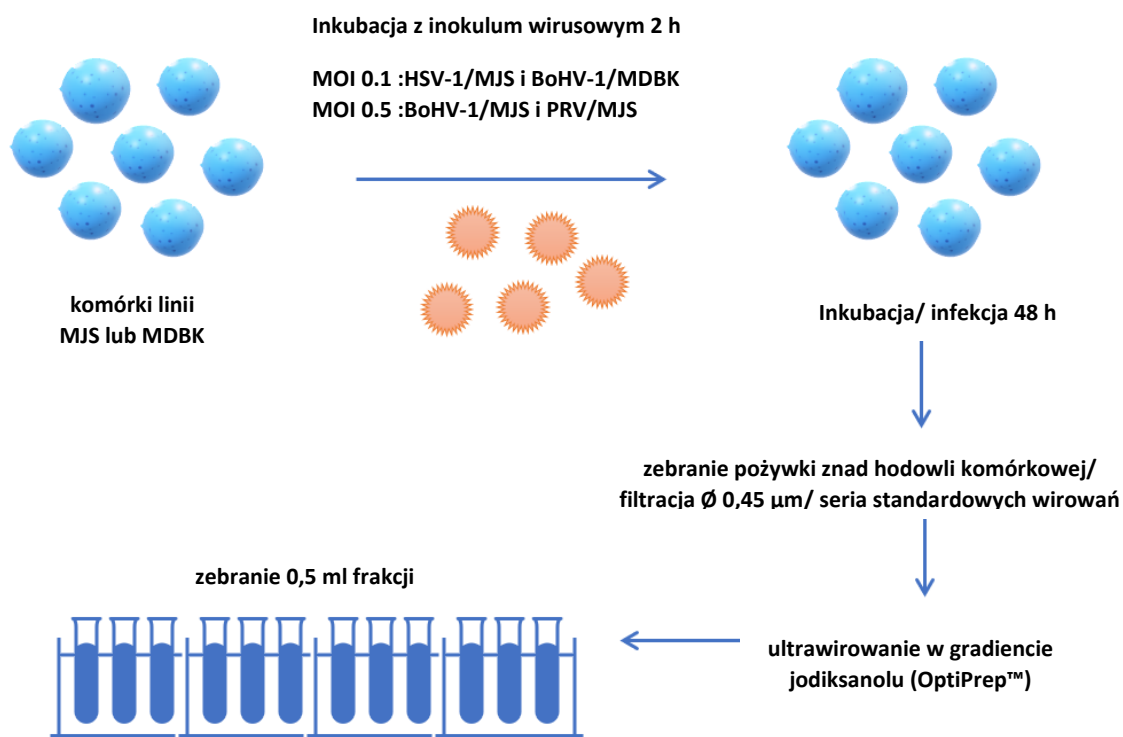
Przeprowadzone eksperymenty wskazują, iż gB HSV-1, BoHV-1 i PRV w różny sposób wpływają na poziom MHC II, zarówno w komórkach, jak i wydzielanych przez komórki pęcherzykach zewnątrzkomórkowych.



**RYCINA 27. Detekcja podjednostek cząsteczek MHC klasy II – DR $\alpha$  i DR $\beta$ .** Za pomocą techniki Western blotting analizowano EVs (taka sama ilość materiału wyjściowego) izolowane metodą SEC. Flotylin-2 (Flot-2) zastosowana jako marker egzosomalowy. DR $\alpha$  i  $\beta$ -aktyna wykrywane w lizatach komórkowych dla porównania. Jednostka masy cząsteczkowej kDa.

### 7.3 Charakterystyka fizyko-biochemiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez komórki podczas infekcji HSV-1, BoHV-1 i PRV

W celu zbadania możliwości inkorporacji homologów gB do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych podczas infekcji wirusowej, dokonano analizy EVs uwalnianych przez zainfekowane komórki. Eksperymenty tego typu niosą wyzwania metodologiczne ze względu na fakt, iż pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i cząstki wirusowe posiadają podobne parametry biofizyczne, m.in. wielkość, co podczas ich wspólnej izolacji może utrudniać uzyskanie preparatów zawierających wyłącznie struktury danego typu. Bazując jednak na różnicy gęstości EVs i wirionów, jest możliwe zastosowanie techniki ultrawierowania w gradiencie jodiksanolu (OptiPrep™) (Dechamps i Kalamvoki, 2016), stąd ta metoda została zastosowana w celu uzyskania modelu badawczego do analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez komórki podczas infekcji HSV-1, BoHV-1 lub PRV. Przy ustaleniu procedury laboratoryjnej, opartej na protokole opisanym w pracy Dechamps i Kalamvoki, została uwzględniona kinetyka infekcji wirusowej dla wybranej linii komórkowej, a schemat procedury izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek infekowanych wirusem przedstawia **Rycina 28**. Kontrole negatywne stanowią komórki MJS i MDBK nieinfekowane, traktowane zgodnie z tą samą procedurą.



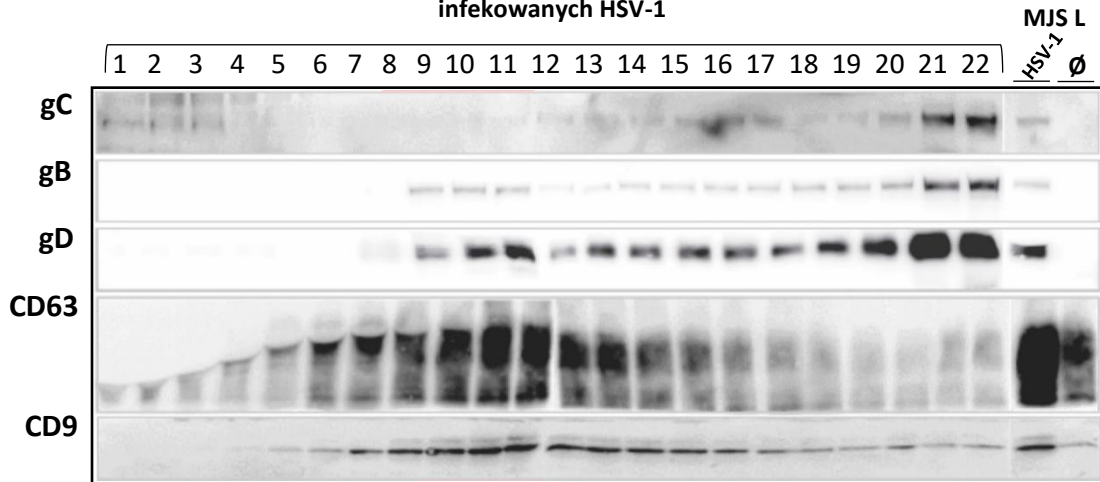
**RYCINA 28.** Schemat procedury izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek infekowanych wirusem. MOI (ang. *multiplicity of infection*) – wielokrotność zakażenia, liczba cząstek wirusa przypadająca na jedną komórkę

Zebrane w układzie góra-dół 0,5 ml frakcje po ultrawierowaniu w gradiencie 6-18% jodiksanolu (OptiPrep™), zostały poddane analizie Western blotting, aby dokonać detekcji markerów EVs i wirusowych (**Rycina 29**). Miana uwalnianych cząstek wirusowych w poszczególnych frakcjach gradientu zostały oznaczone w teście łysinkowym (ang. *plaque assay*) (**Rycina 30**).

Otrzymane wyniki wskazują, że detekcja markerów EVs (CD63, CD9) była możliwa głównie we frakcjach o niższej gęstości: 8–12 (licząc w układzie góra-dół), zarówno w przypadku wykorzystania jako materiał wyjściowy pożywki z hodowli nieinfekowanych, jak i infekowanych (HSV-1, BoHV-1 i PRV) komórek MJS. Nieco odmienny wzór zaobserwowano dla analizowanych frakcji otrzymanych z pożywki z hodowli infekowanych wirusem BoHV-1 komórek MDBK, gdzie białko markerowe Alix gromadziło się we frakcjach: 9–13, a także we frakcjach o większej gęstości: 17–20. Niewielkie ilości białek markerowych, zwłaszcza CD9, były także obecne w dolnej części niektórych gradientów.



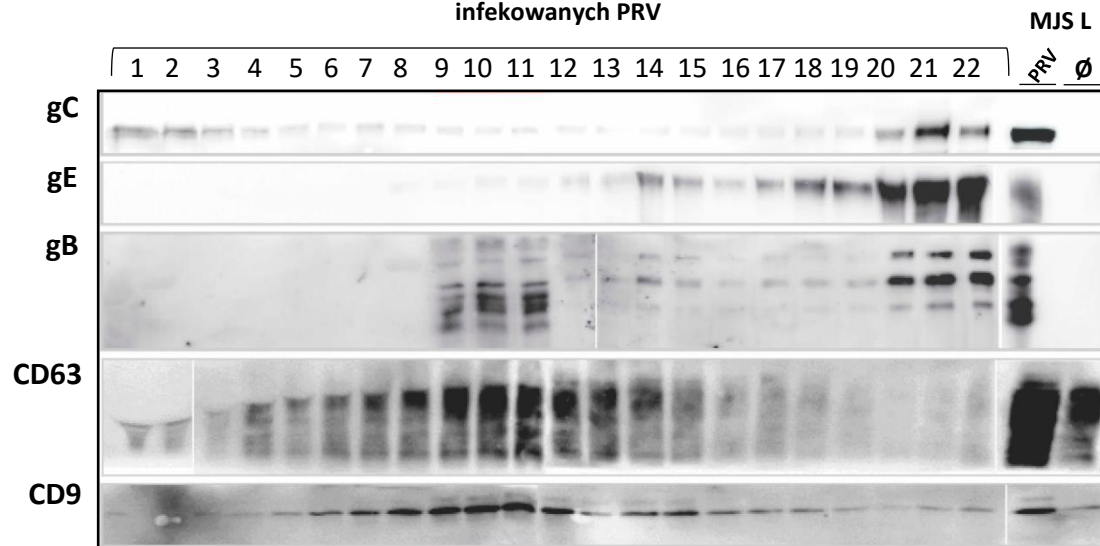
Fracje OptiPrep™ 6-18% uzyskane z izolacji EVs z pożywki znad komórek MJS  
infekowanych HSV-1

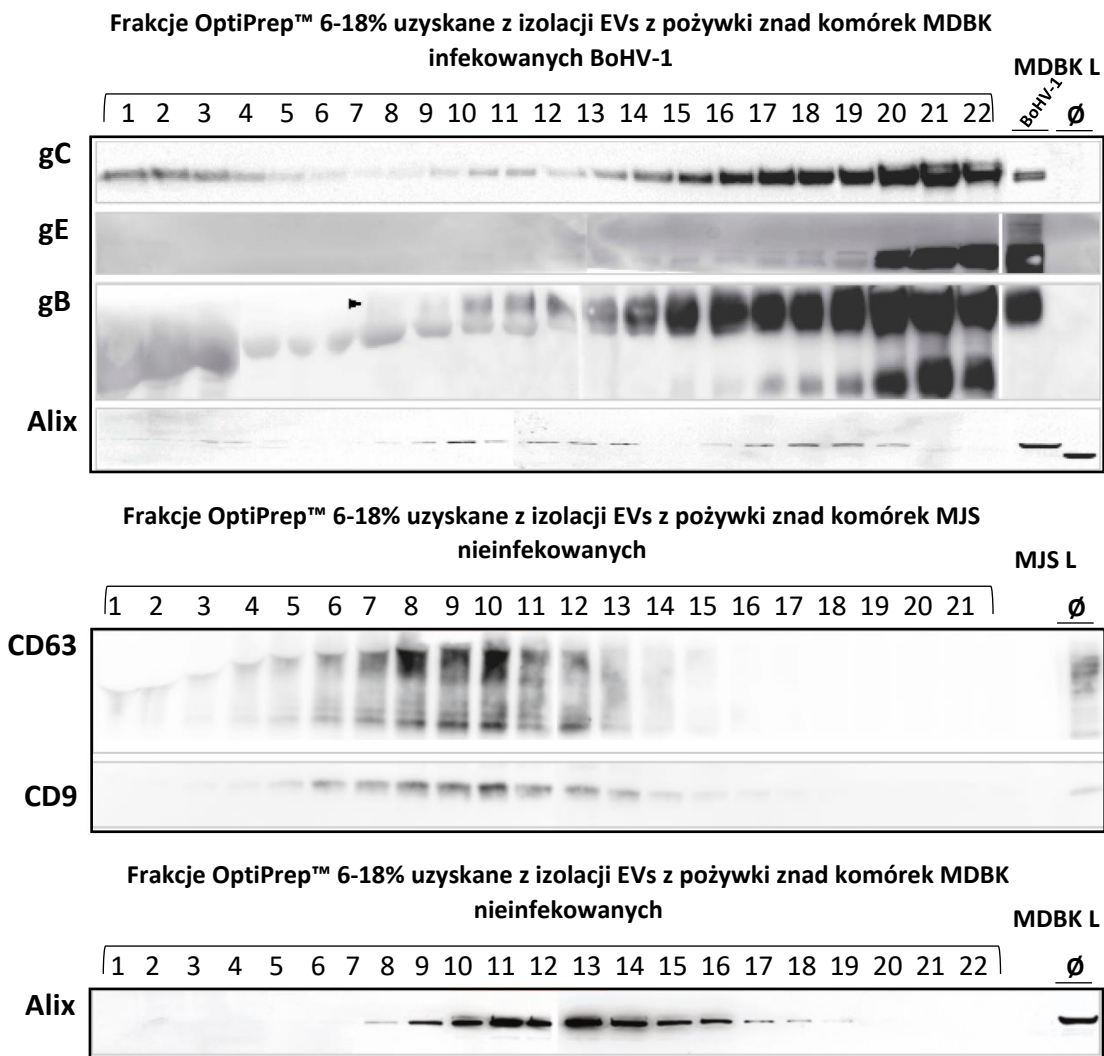


Fracje OptiPrep™ 6-18% uzyskane z izolacji EVs z pożywki znad komórek MJS  
infekowanych BoHV-1

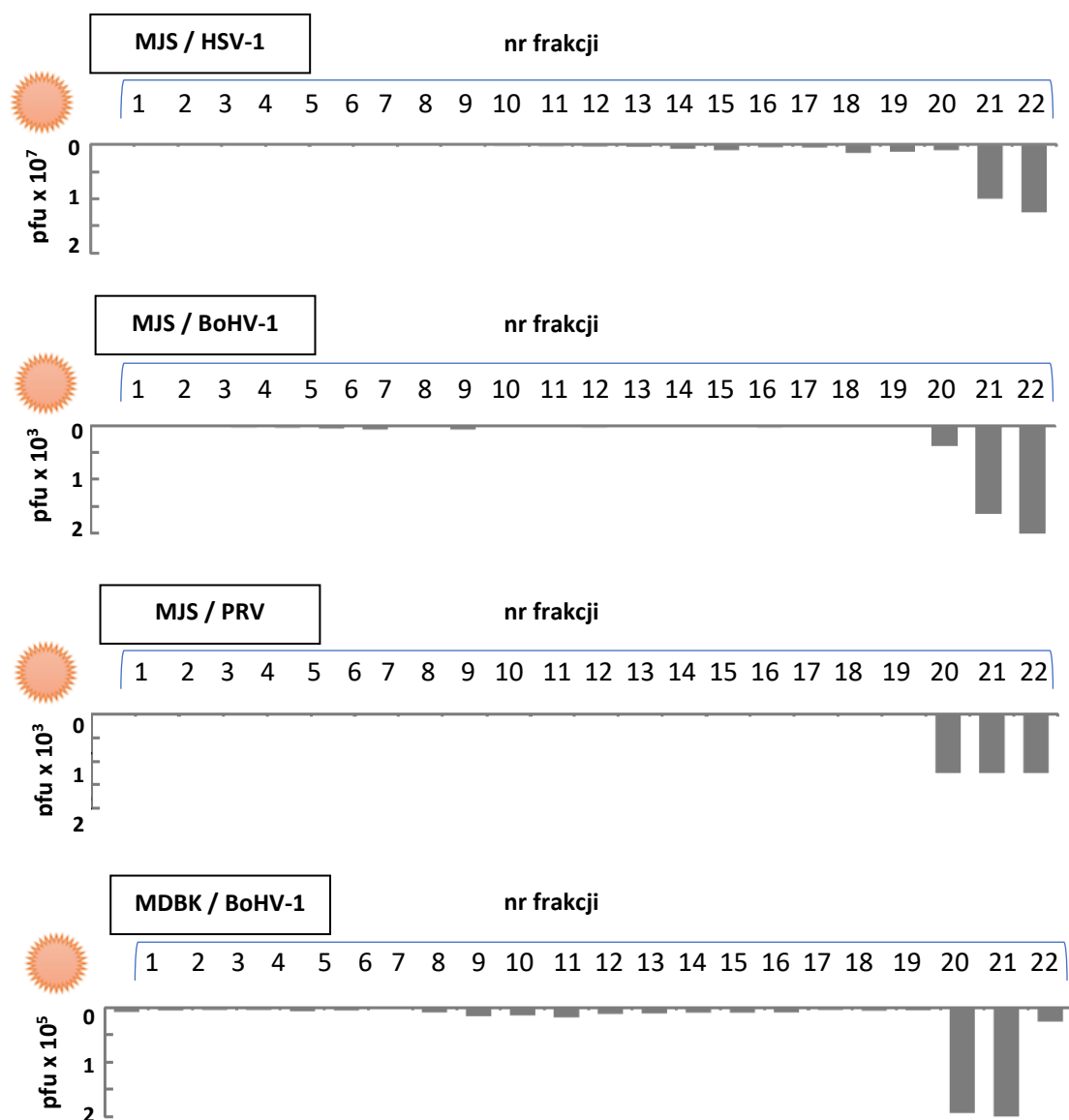


Fracje OptiPrep™ 6-18% uzyskane z izolacji EVs z pożywki znad komórek MJS  
infekowanych PRV





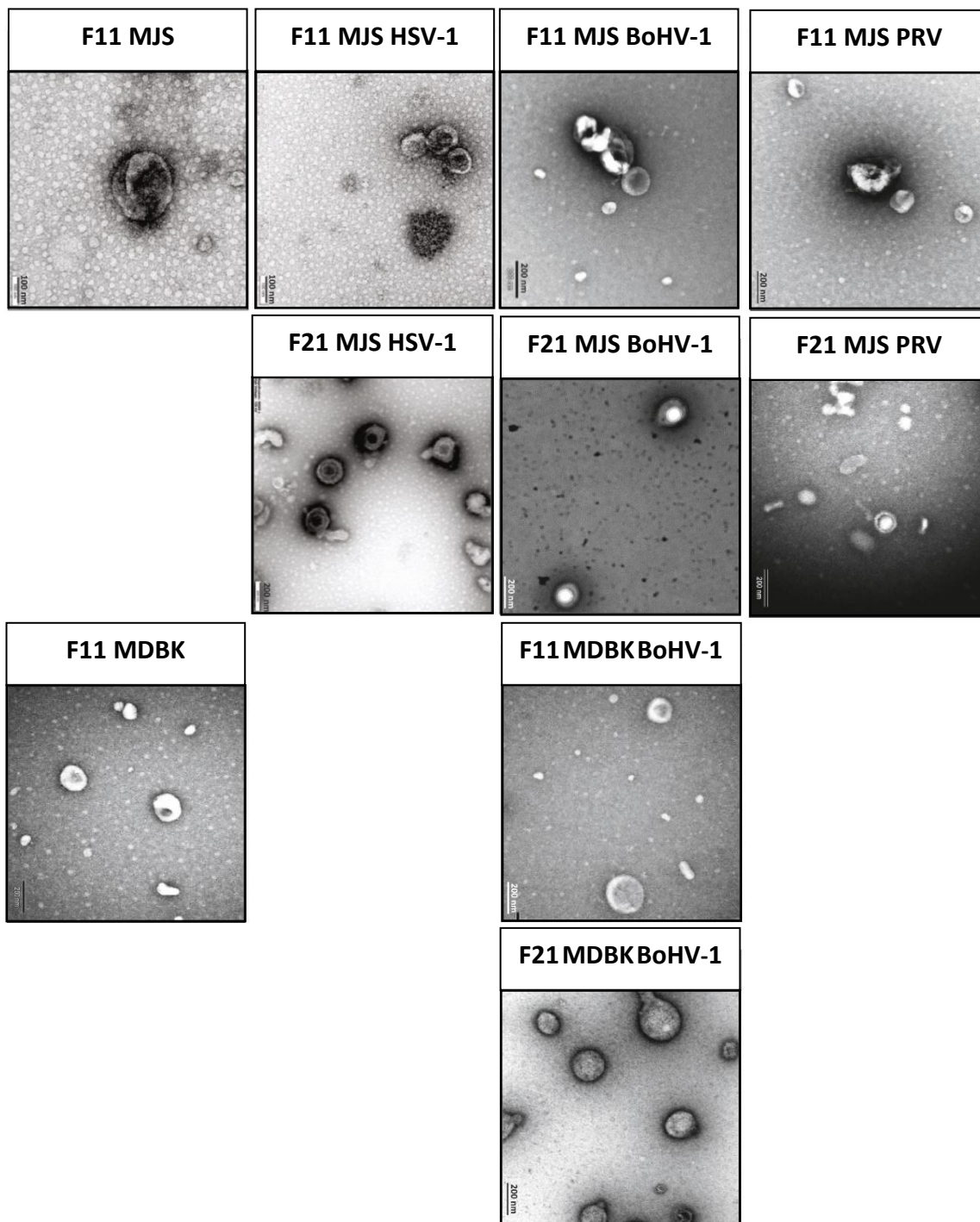
**RYCINA 29. Analiza frakcji zebranych podczas izolacji i oczyszczania EVs uwalnianych przez komórki podczas infekcji HSV-1, BoHV-1 lub PRV** 40 µl z 0,5 ml każdej zebranej frakcji rozdzielano za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym, aby przy użyciu metody Western blotting i z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, dokonać detekcji markerów pęcherzykowych (CD63, CD9, Alix) i białek wirusowych (gB, gC, gD, gE). L – lizat komórkowy, ∅ – komórki nieinfekowane. Numeracja frakcji zebranych w układzie góra-dół.



RYCINA 30. Oznaczenie miana uwalnianych cząstek wirusowych w poszczególnych frakcjach gradientu zebranych podczas izolacji i oczyszczania EVs uwalnianych przez komórki podczas infekcji HSV-1, BoHV-1 lub PRV za pomocą testu łyśinkowego. pfu – (ang. *plaque forming unit*) – jednostka tworząca łyśinkę. Numeracja frakcji zebranych w układzie góra-dół.

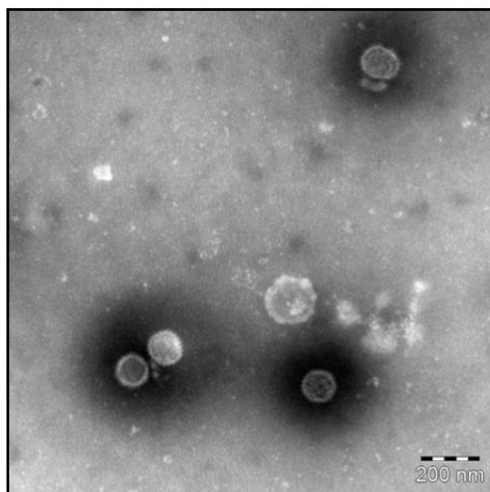
Glikoproteiny wirusowe wykrywano w kilku frakcjach, które mogły reprezentować pęcherzyki o różnej wielkości i gęstości. Poziom gC i gE we frakcjach o małej gęstości nie był wysoki i znacząco niższy niż we frakcjach o dużej gęstości lub dolnych (21-22), zawierających (na podstawie testu łyśinkowego) wiriony, dla których sygnał gC i gE był wyraźny. Jednakże, dla gB i gD HSV-1 obserwowano silniejszy sygnał we frakcjach pokrywających się z tymi, które prezentowały obecność markerów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Zakaźność wirusa dla tych frakcji, oszacowana na podstawie wielkości miana wirusa badanego za pomocą testu łyśinkowego, była niższa, co wskazuje, iż zanieczyszczenie cząstkami zakaźnymi było marginalne. W oparciu o uzyskane rezultaty stwierdzono otrzymanie frakcji wzbogaconych w EVs (8-15) oraz frakcji zawierające duże ilości cząstek wirusowych (20-22) (**Rycina 29**).

W celu uzyskania informacji na temat morfologii i średnicy struktur w izolowanym materiale dokonano obserwacji z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego frakcji: F11 – o najwyższym poziomie markera EVs – zawierającą prawdopodobnie mniejsze pęcherzyki i F21 – o najwyższej zawartości glikoprotein wirusowych – zawierającą prawdopodobnie wiriony (**Rycina 31**). Uzyskany obraz mikroskopowy dla frakcji F11 przedstawia struktury pęcherzykowe charakterystyczne dla EVs (**Rycina 31**).



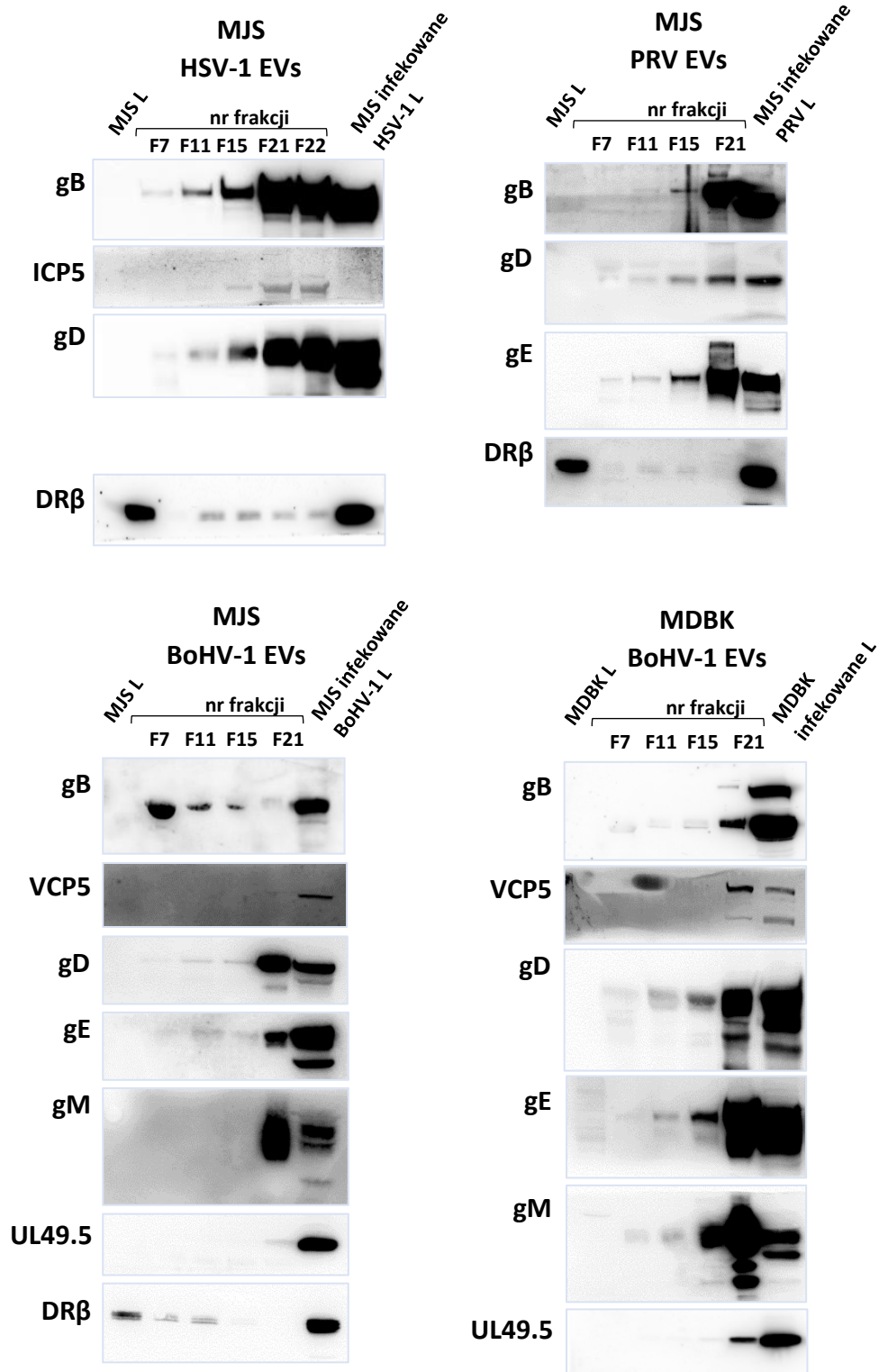
**RYCINA 31. Analiza z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego wybranych frakcji zebranych podczas izolacji i oczyszczania EVs uwalnianych przez komórki podczas infekcji HSV-1, BoHV-1 lub PRV. Przedstawiono reprezentatywne obrazy dla frakcji komórek nieinfekowanych F11 MJS i F11 MDBK oraz infekowanych (F11/ nazwa wirusa i F21/ nazwa wirusa). Numeracja frakcji zebranych w układzie góra-dół.**

We frakcji F21 natomiast widoczne były głównie błoniaste struktury o dużej gęstości elektronicznej zawierające wewnątrz ładunek przypominający ikozaedralne kapsydy herpeswirusowe (**Rycina 31**), jak publikowane wcześniej (**Rycina 32**). We frakcji izolowanej z komórek MJS infekowanych wirusem HSV-1 obserwowano cząstki o nietypowym, częściowo rurkowatym kształcie i nieliczne puste pęcherzyki (**Rycina 31**).



**RYCINA 32.** Opublikowana przykładowa analiza TEM frakcji wirionów BoHV-1 oczyszczonych przez ultrawierowanie na poduszce sacharozowej (na podstawie Hoferer i wsp., 2017).

W kolejnym etapie postanowiono dokładniej przeanalizować techniką Western blotting występowanie różnych białek wirusowych we frakcjach F7 (mogącej zawierać agregaty białek i małe pęcherzyki), F11, F15 (zawierającej prawdopodobnie większe pęcherzyki) oraz F21 (dla gradientu MJS HSV-1 także F22). Wykazano obecność wszystkich testowanych glikoprotein (gB, gD, dla BoHV-1 i PRV również gE) w badanych frakcjach, gdzie najsilniejszy sygnał był widoczny dla frakcji F21 (dla gradientu MJS HSV-1 także F22). Dla MJS BoHV-1 tworzące kompleks glikoproteinę gM i główne wirusowe białko immunomodulacyjne UL49.5 wykryto jedynie we frakcjach o większej gęstości. Również dolne frakcje gradientów z MJS BoHV-1 i HSV-1 zawierały główne białko kapsydu VP5/ICP5 (dla PRV nie dysponowano przeciwciałami specyficznymi dla głównego białka kapsydu). Jako kontrole zastosowano lizaty komórek nieinfekowanych i infekowanych, a detekcję białka DR $\beta$  zastosowano dodatkowo jako marker EVs (**Rycina 33**).



**RYCINA 33. Analiza wybranych frakcji zebranych podczas izolacji i oczyszczania EVs uwalnianych przez komórki podczas infekcji HSV-1, BoHV-1 lub PRV** 40  $\mu$ l z 0,5 ml każdej zebranej frakcji rozdzielano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, aby przy użyciu metody Western blotting i z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, dokonać detekcji wybranych białek. ICP5/VCP5 – homolog HSV-1 i BoHV-1 – główne białko kapsydowe, UL49.5 – białko immunomodulatorowe, gD/gM – wirusowe glikoproteiny osłonki, DRβ – marker EVs, L – lizat komórkowy (30  $\mu$ g). Numeracja frakcji zebranych w układzie góra-dół.



## 7.4 Znaczenie biologiczne inkorporacji homologów gB wybranych przedstawicieli alfaherpeswirusów do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

W celu weryfikacji hipotezy o dodatkowej – immunomodulacyjnej – funkcji gB, zakotwiczonej w błonie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, wykonano dwa eksperymenty mogące dostarczyć informacje dotyczące tego mechanizmu: badanie zdolności wiązania przeciwciał koziej surowicy anti-BoHV-1 przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe-gB BoHV-1-pozytywne w teście ELISA oraz badanie wychwytywania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych-gB HSV-1 pozytywnych przez komórki ssacze (ang. *extracellular vesicles uptake*).

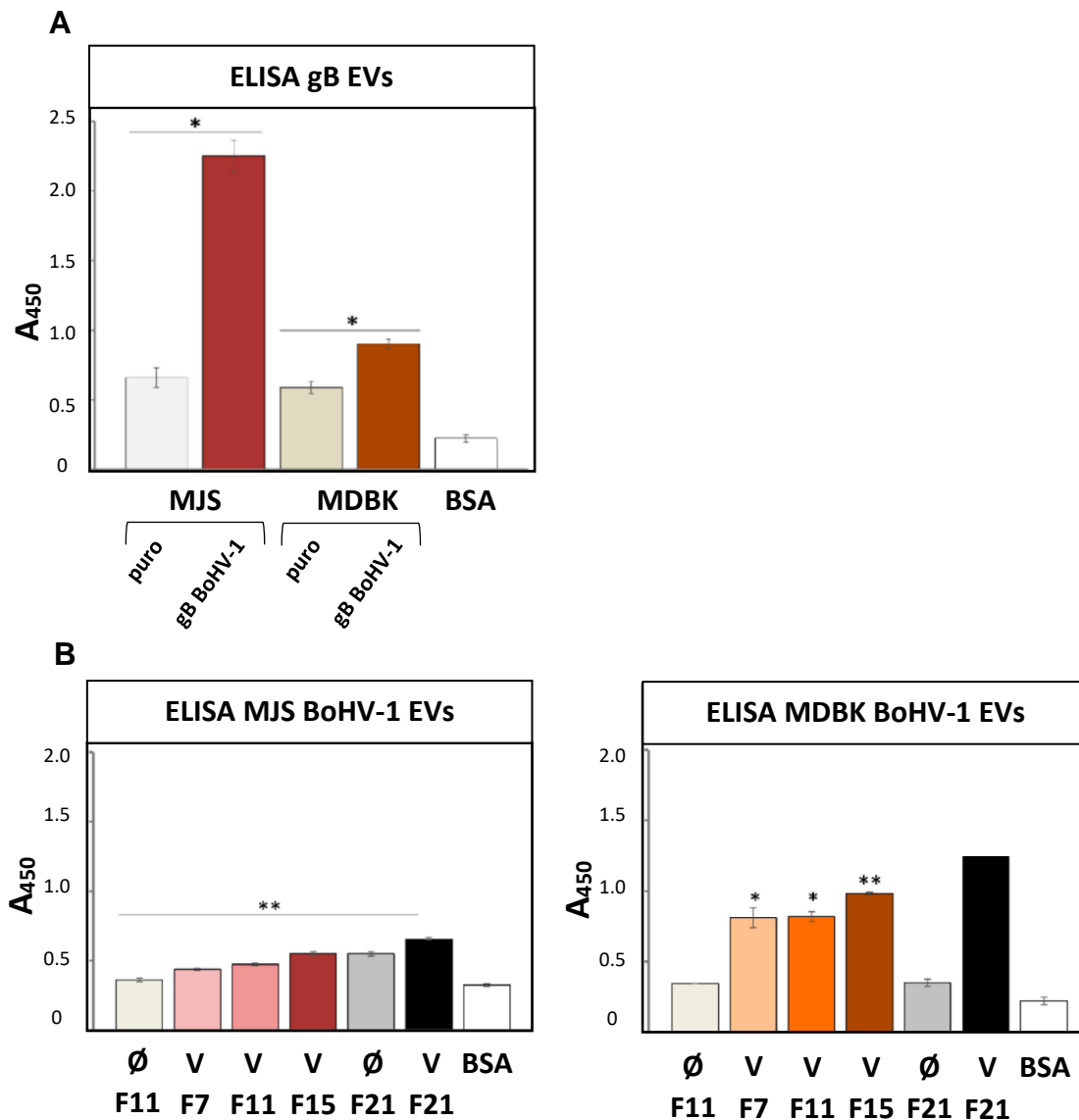
### 7.4.1 Badanie zdolności wiązania przeciwciał surowicy anti-BoHV-1 przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe-gB BoHV-1 pozytywne

Za pomocą testu ELISA zbadano zdolność wiązania przeciwciał surowicy koziej (otrzymanej przez immunizację zwierzęcia pełną formą cząstki wirusowej BoHV-1) przez EVs gB BoHV-1-pozytywne. Do przeprowadzenia eksperymentu wykorzystano płytkę z naniesioną taką samą ilością materiału EVs izolowanych metodą SEC z otrzymanych linii komórkowych (MJS i MDBK) ze stabilną produkcją gB BoHV-1 oraz wybrane frakcje z analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez komórki podczas infekcji BoHV-1.

Zaobserwowano zdolność wiązania przez EVs gB BoHV-1 pozytywne zastosowanych w tym doświadczeniu przeciwciał komercyjnie dostępnej koziej surowicy anti-BoHV-1. Sygnał dla EVs znad MJS gB BoHV-1 znacznie przewyższał ten uzyskany dla EVs izolowanych z MDBK gB BoHV-1, co może być wynikiem takich modyfikacji posttranslacyjnych i/lub konformacyjnych gB w linii MJS, które zwiększają jej specyficzne wiązanie do przeciwciał surowicy (**Rycina 34 A**). Inkorporacja gB BoHV-1 w EVs z obu linii komórkowych, jak wykazano w p. 7.2.2. była podobna. Także dla kontrolnych EVs (izolowanych z linii komórkowych bez gB BoHV-1) odnotowano sygnał nieco ponad poziom zastosowanej kontroli - 1% roztworu BSA/PBS. Być może działa się tak ze względu na zdolność pewnych receptorów EVs do wiązania immunoglobulin. Specyficzna reakcja dla przeciwciał surowicy anti-BoHV-1 została odnotowana w przypadku frakcji F7, F11, F15 i F21 otrzymanych z pożywki hodowlanej znad komórek (MJS i MDBK) infekowanych wirusem BoHV-1. Najsilniejszy sygnał



obserwowano dla frakcji komórek zainfekowanych F21 zawierającej wiriony, a wyraźniejszą zdolność wiązania przeciwciał odnotowano dla materiału pochodzącego z komórek MDBK infekowanych BoHV-1, co może wiązać się z dynamiką poziomu zakażenia i większymi ilościami produkowanych białek wirusowych (Rycina 34 B).



**RYCINA 34. Wynik testu ELISA badającego zdolność wiązania przeciwciał surowicy BoHV-1-specyficznej przez EVs gB-BoHV-1 pozytywne.** A – detekcja białek BoHV-1 w materiale izolowanym z otrzymanych linii stabilnych. Sygnał z EVs zawierających gB porównano z sygnałem z EVs MJS/MDBKpuro. B – detekcja białek BoHV-1 w materiale izolowanym w gradiencie OptiPrep (frakcje F7, F11, F15 i F21) z komórek MDBK/MJS nieinfekowanych (∅) lub infekowanych (V) wirusem BoHV-1. Sygnał z materiału zainfekowanego wirusem był porównywany z sygnałem z odpowiednich frakcji F11 lub F21 z niezainfekowanych MJS/MDBK. Analiza przeprowadzana z wykorzystaniem koziej surowicy anti-BoHV-1. 1% BSA/PBS służył jako kontrola tła. Każda reakcja była wykonana w trzech powtórzeniach, a słupki przedstawiają średnią absorbancji przy 450 nm z odchyleniami standardowymi; istotność statystyczną oszacowano za pomocą testu t-studenta (rozkład dwustronny z wariancją heteroscedastyczną); \* p 0,01, \*\* p 0,001.

#### *7.4.2 Test wychwytywania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych-gB-HSV-1 pozytywnych przez komórki ssacze (ang. extracellular vesicles uptake)*

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pełnią funkcję w komunikacji międzykomórkowej poprzez transport ładunku biologicznego (białek, metabolitów, kwasów nukleinowych) pomiędzy komórkami dawcy i biorcy. Chcąc prześledzić ten proces w warunkach laboratoryjnych oraz zbadać wpływ obecności gB na ten proces przygotowano preparat EVs znakowanych fluorescencyjnie, który został wykorzystany w eksperymencie wychwytywania EVs-gB HSV-1-pozytywnych przez komórki ssacze Huh7.

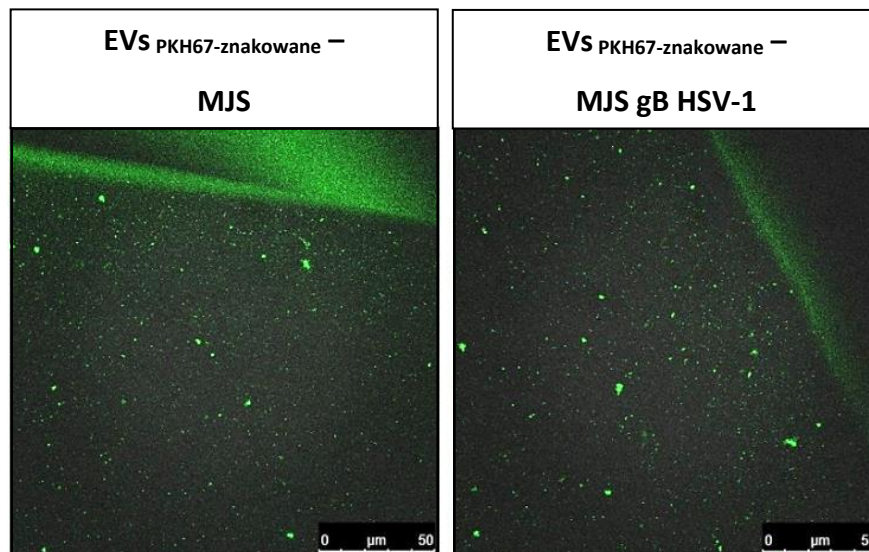
##### *7.4.2.1 Ocena możliwości zastosowania znacznika zielonej fluorescencji dla ogólnego barwienia błony komórkowej – PKH67 – do znakowania preparatów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych*

Postępując zgodnie z ustaloną procedurą izolacji EVs metodą SEC (rekomendowaną do analiz funkcjonalnych EVs, jako najmniej inwazyjną i nie naruszającą struktury pęcherzyków w trakcie jej przeprowadzania) otrzymano pulę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z linii komórkowych MJS i MJS gB HSV-1.

Do znakowania EVs zastosowano znacznik zielonej fluorescencji PKH67 – przeznaczony do ogólnego znakowania błon komórkowych. PKH67, a także należący do tej samej grupy – barwnik czerwonej fluorescencji – PKH26 są powszechnie stosowanymi reagentami w eksperymentach z wykorzystaniem znakowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, gdyż w przeciwieństwie do innych dostępnych znaczników błon, ich użycie nie niesie ryzyka barwienia niespecyficznego błon komórek biorcy na drodze dyfuzji fluoroforu pomiędzy błonami, ze względu na silne i specyficzne wiązanie do łańcuchów lipidowych. Ponadto, protokół barwienia EVs zapobiega pozostawieniu zanieczyszczenia, w postaci niezwiązanego znacznika, w końcowym produkcie, przez oddzielenie niezwiązanej frakcji barwnika na kolumnie ultrafiltrującej typu *Amicon*<sup>®</sup>.

Jakość uzyskanego preparatu barwionych EVs pochodzących z linii komórkowych MJS i MJS gB HSV-1 zweryfikowano poprzez obserwację mikroskopową kropli preparatu znakowanych EVs naniesionej na szkiełko podstawowe – widoczna jest

granica faz oraz równomiernie rozłożone, podobnej wielkości, punktowe struktury w obszarze kropli (**Rycina 35**).



**RYCINA 35.** Obraz mikroskopowy preparatu EVs PKH67-znakowanych pochodzących z linii komórkowych MJS i MJS gB HSV-1.

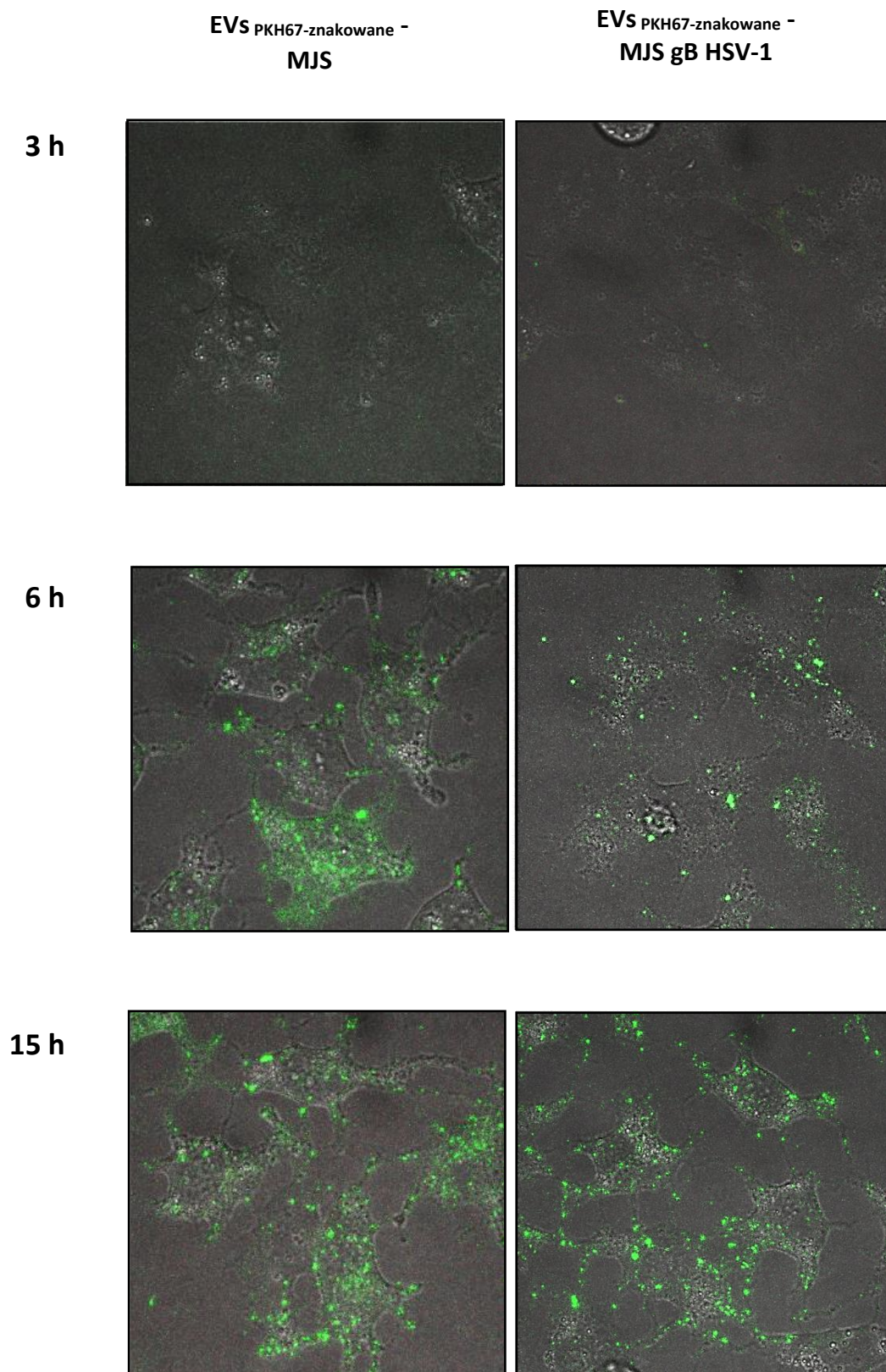
#### *7.4.2.2 Obserwacja wychwytywania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych-gB HSV-1 pozytywnych przez komórki ssacze Huh7 z uwzględnieniem badania kierowania znakowanych struktur biologicznych na ścieżkę lizosomalną*

W kolejnym etapie przeprowadzono eksperyment wychwytywania znakowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z linii komórkowych MJS i MJS gB HSV-1 przez ludzkie komórki linii Huh7 – izolowanej z guza nowotworowego wątroby. Wyboru linii komórkowej dokonano na podstawie danych literaturowych wskazujących na zwiększoną podatność tworzenia przerzutów w chorobie nowotworowej skóry (linia MJS, z której otrzymano preparat EVs wywodzi się z guzów czerniaka) do płuc, kości i wątroby (Ackermann i wsp., 2005; Abdel-Rahman, 2019) oraz na podstawie hipotezy o powinowactwie EVs produkowanych przez komórki nowotworowe do określonych tkanek i ich roli w tworzeniu tzw. niszy premetastatycznej (Tucci i wsp., 2018). Komórki Huh7 dodatkowo, ze względu na swój rozmiar i morfologię, pozwalają na wiarygodne i dobrej jakości obserwacje mikroskopowe.

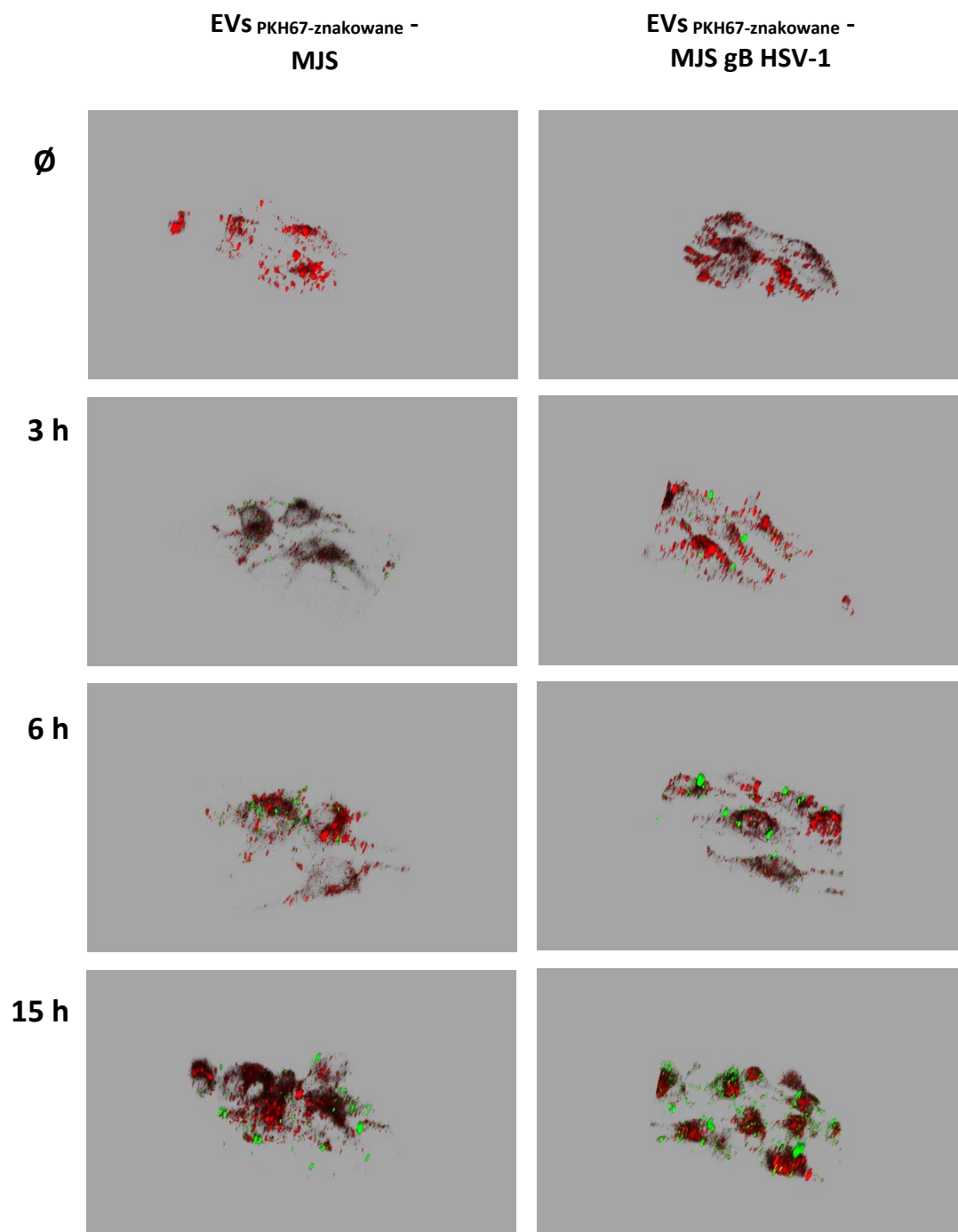
Po wstępnym etapie optymalizacji ilości dodawanego materiału, liczby komórek użytych w doświadczeniu oraz przedziałów czasowych

na dokonywane obserwacje przyżyciowe, otrzymano serie zdjęć (**Rycina 37 i Rycina 38**) oraz filmów z mikroskopowego zapisu poklatkowego przeprowadzonego eksperymentu, załączone do niniejszej pracy na nośniku danych (**Rycina 36**).

Uzyskane obserwacje wskazują na internalizację EVs z komórek MJS do komórek Huh7 zarówno w przypadku obecności lub braku gB HSV-1. Poprzez znakowanie barwnikiem czerwonej fluorescencji – LysoTracker – organelli o kwaśnym odczynie pH w badanych komórkach i rekonstrukcję 3D obrazu mikroskopowego z przeprowadzonego testu potwierdzono występowanie PKH67-znakowanych EVs wewnątrz komórki biorcy (**Rycina 37**). Ponadto, chociaż pomiędzy inkorporacją EVs niosących białko gB lub pozbawionych jego obecności, nie obserwowano znaczących różnic w kinetyce czy mechanizmie pobierania materiału do wnętrza komórki, wyniki wskazują na zwiększoną akumulację pęcherzyków MJS-gB HSV-1 w przedziale perinuklearnym (**Rycina 37 i Rycina 38**).

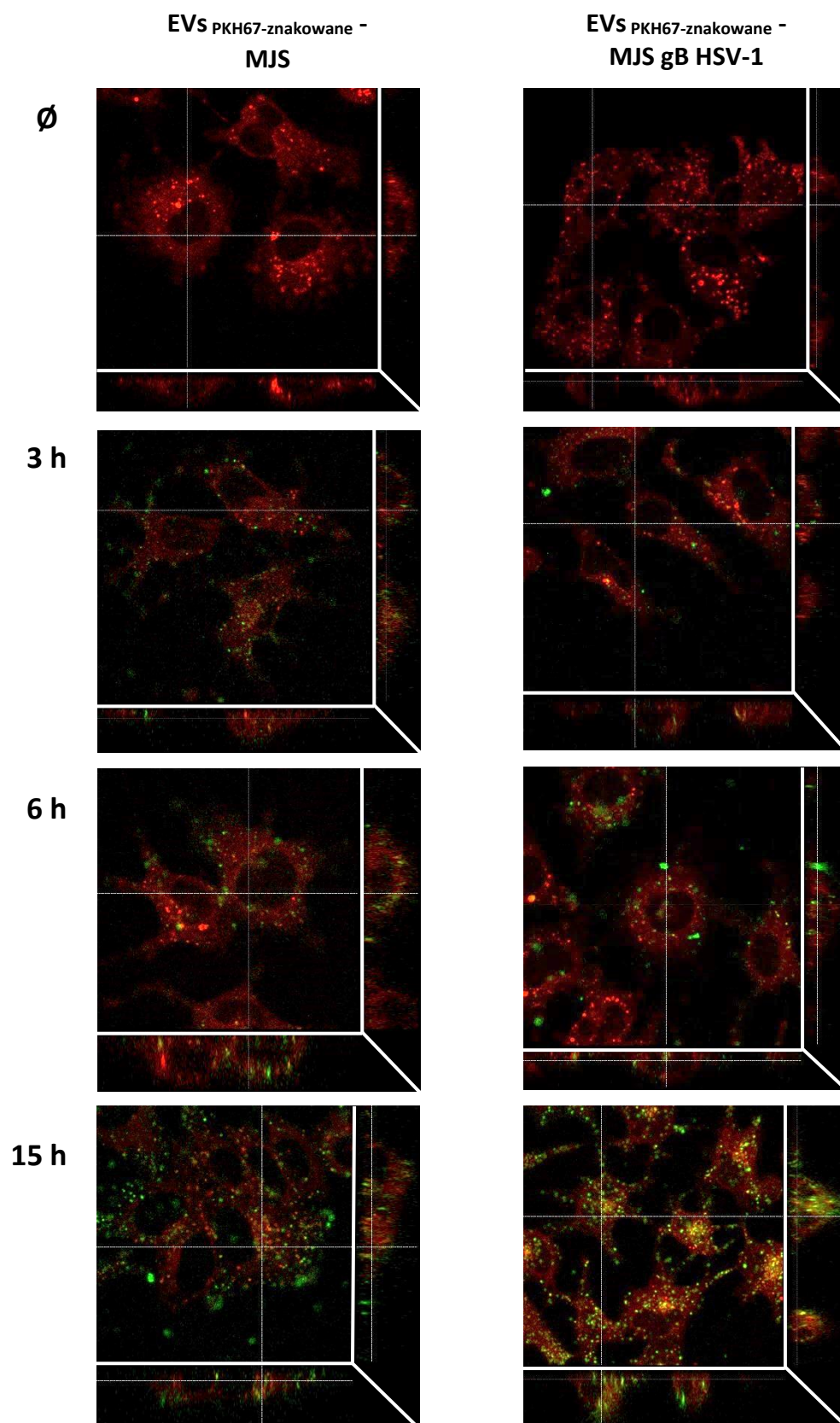


RYCINA 36. Pojedyncze obrazy poklatkowego zapisu mikroskopowego testu wychwytywania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych-gB HSV-1 pozytywnych przez komórki ssące Huh7. EVs – znakowane PKH67 (zielony).



RYCINA 37. Rekonstrukcja 3D obrazu mikroskopowego z przeprowadzonego testu wychwytywania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych-gB HSV-1 pozytywnych przez komórki ssacze Huh7 z uwzględnieniem badania kierowania znakowanych struktur biologicznych na ścieżkę lizosomalną. EVs – znakowane PKH67 (**zielony**), organelle ścieżki lizosomalnej – znakowane LysoTracker (**czerny**).





RYCINA 38. Pudełkowy obraz mikroskopowy przeprowadzonego testu wychwytywania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych-gB HSV-1 pozytywnych przez komórki ssacze Huh7 z uwzględnieniem badania kierowania znakowanych struktur biologicznych na ścieżkę lizosomalną. EVs – znakowane PKH67 (zielony), organelle ścieżki lizosomalnej – znakowane LysoTracker (czerwony).

## 8 DYSKUSJA

Zakażenia herpeswirusowe mają szczególne znaczenie epidemiologiczne, głównie ze względu na powszechność infekcji, szybkie tempo ich rozprzestrzeniania się oraz ograniczoną możliwość kontroli zakażeń spowodowaną, m.in. występowaniem latencji oraz działania wirusowych strategii modulowania odpowiedzi immunologiczną. O ile infekcja może przebiegać łagodnie lub bezobjawowo, w niektórych przypadkach istnieje ryzyko powikłań i rozwinięcia chorób związanych z zakażeniem herpeswirusami, np.: cytomegalia, półpasiec, mięsak Kaposiego, nowotwory związane z infekcją wirusem Epsteina-Barr. Z kolei aktywne infekcje herpeswirusowe występujące u zwierząt hodowlanych powodują znaczące straty ekonomiczne.

Przedstawiona praca opisuje analizę interakcji glikoproteiny B wybranych alfaherpeswirusów z białkami szlaku endosomalno-egzosomalnego oraz cząsteczkami MHC klasy II. Glikoproteina B należy do produktów tzw. *core genes* (ang.), występujących u wszystkich herpeswirusów; jednocześnie jest to jedno z najbardziej konserwowanych herpeswirusowych białek pod względem sekwencji aminokwasowej i struktury (Vollmer i Grünewald, 2020; Cairns i Connolly, 2021). Dotychczas została szczegółowo opisana rola gB, w mechanizmie wnikania wirusa do komórki gospodarza. Główny przedmiot zainteresowania niniejszej pracy stanowiły badania nad formą gB syntetyzowaną w komórce gospodarza, na późniejszych etapach infekcji.

Podstawę moich narzędzi badawczych stanowiły uzyskane linie stabilne wybranych komórek ssaczy z konstytutywną ekspresją homologu gB wybranych alfaherpeswirusów: HSV-1, BoHV-1 lub PRV, a także komórki ssacze infekowane wymienionymi wirusami, w oparciu o które i z wykorzystaniem odpowiednich technik przeprowadziłam doświadczenia charakteryzujące interakcję badanych gB z białkami szlaku endosomalno-egzosomalnego oraz cząsteczkami MHC klasy II.

Wysoki stopień konserwacji sekwencji nukleotydowej genów gB i przestrzennej struktury białkowej między homologami gB alfaherpeswirusów mógłby sugerować zachowanie poszczególnych funkcji glikoproteiny. Jednak pewne różnice w właściwościach homologów gB alfaherpeswirusów zostały wcześniej odnotowane, m.in. odmienne wiązanie z immunoglobulinopodobnymi receptorami PILR (ang. *paired immunoglobulin-like type 2 receptor*) podczas etapu wejścia wirusa do komórki: gB HSV-1 oddziałuje z PILR $\alpha$



(Satoh i wsp., 2008), natomiast gB PRV z PILR $\beta$  (De Pelsmaeker i wsp., 2019). Staralam się zwrócić szczególną uwagę na konserwację ewolucyjną przez porównanie właściwości gB BoHV-1 i PRV, które nie były wcześniej opisane w literaturze, z gB wirusa HSV-1, wybraną jako kontrola pozytywna, ze względu na udokumentowane wcześniej interakcje z MHC II oraz obecność w egzosomach (Sievers i wsp., 2002; Neumann i wsp., 2003, Temme i wsp., 2010; Niazy i wsp., 2017). Wirusy BoHV-1 i PRV stanowią od lat przedmiot badań w naszym zespole badawczym. Należące do rodzaju *Varicellovirus* BoHV-1 i PRV są ze sobą bliżej spokrewnione ewolucyjnie, niż przynależny do rodzaju *Simplexvirus* HSV-1 (McGeoch i wsp., 2008). Otrzymane wyniki wskazują na konserwowaną u wszystkich trzech herpeswirusów zdolność gB do inkorporacji do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, co dla białek BoHV-1 i PRV wykazałam po raz pierwszy. Biorąc pod uwagę wcześniejsze badania nad gB HSV-1 i HCMV (Temme i wsp., 2010; Zicari i wsp., 2018), można wnioskować, iż ten mechanizm jest powszechny dla gB wszystkich herpeswirusów. Potwierdziłam obecność gB HSV-1, BoHV-1 i PRV w EVs izolowanych ze wszystkich badanych linii stabilnych, niezależną od endogennego występowania cząsteczek MHC klasy II (również w MHC II-negatywnych komórkach SK6 i Jurkat). Ponadto, zaobserwowałam występowanie gB w EVs z dwóch innych linii komórek MHC II-negatywnych, skonstruowanych w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów MWB UG-GUMed (gB PRV w linii komórek epitelialnych świńskiego jądra ST i gB BoHV-1 w immortalizowanej linii bydlęcych makrofagów). Fakt niższego poziomu gB HSV-1 obserwowanego dla MHC II-negatywnych EVs, pochodzących z linii komórkowej ludzkiego chłoniaka (Jurkat), może wynikać z odmiennej, charakterystycznej dla tej linii komórkowej, ekspresji genu wirusowego (same komórki wymagały aktywacji w celu uzyskania skutecznej ekspresji zależnej od promotora retrowirusa). Należy zaznaczyć, iż Niazy i wsp. również wykazali możliwość izolowania EVs zawierających gB HSV-1 z pożywki hodowlanej linii komórek MHC II-negatywnych - ludzkich płodowych fibroblastów IMR90S i komórek nerki makaka COS-7 (Niazy i wsp., 2017).

Jeden z wskazanych w literaturze mechanizmów inkorporacji ładunku biologicznie czynnego do EVs, powiązany z powstawaniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, zachodzi na szlaku endosomalnym. Jedną z hipotez w pracy Niazy i wsp., sugerowała, że gB obecne w EVs trafia do pęcherzyków na drodze endocytozy glikoproteiny z powierzchni błony komórkowej (Niazy i wsp., 2017), co nie znajduje potwierdzenia w przeprowadzonych przeze mnie metodą mikroskopii konfokalnej obserwacjach panelu komórek MJS.

Uzyskane wyniki wskazują, że poziom ko-lokalizacji gB z białkami markerowymi wczesnych i recyrkulujących endosomów był niższy, natomiast wyższy w przypadku wizualizacji gB i struktur późnych endosomów i lizosomów. Ponadto, obecność w komórkach gB HSV-1, BoHV-1 lub PRV zwiększała poziom ko-lokalizacji CD63-MHC II w komórkach MJS, co może wskazywać na zmiany w architekturze szlaku endosomalnego/kompartementu MIIC i powinno zostać bardziej szczegółowo zbadane, np. poprzez analizę oddziaływania gB z CD63. Należy także zaznaczyć, że tylko w przypadku gB HSV-1 odnotowałam znaną z literatury zdolność do indukowania powstawania struktur powiększonych endosomów (ang. *giant endosomes*), co wskazuje na kolejną odmienną właściwość homologu HSV-1 tego białka. Kontynuacja badania tego zagadnienia powinna uwzględnić eksperymenty porównujące aktywność poszczególnych alfaherpeswirusowych homologów gB do indukowania fuzji wczesnych endosomów, a przez to wywoływania zmian architektury endosomalnej i transportu wewnątrzkomórkowego.

Wzór glikozylacji, z nielicznymi różnicami pomiędzy homologami gB obecnymi w EVs, wskazuje na obecność N-glikanów odpornych na działanie EndoH, przez co uzyskany w tej pracy wynik nie koresponduje z sugestią Niazy i wsp. o tym, iż gB jest kierowane na szlak endosomalno-egzosomalny bezpośrednio z retikulum endoplazmatycznego (Niazy i wsp., 2017). Modyfikacje N-glikanów, skutkujące ich niewrażliwością na endoH, mają bowiem miejsce w aparacie Golgiego, podobnie jak trawienie furyną (Molloy i wsp., 1994).

Obok konserwowanej zdolności gB do inkorporacji do EVs, zaobserwowałam odmienny wpływ homologów na powierzchniowy poziom MHC II i w tym zakresie podobny efekt działania danego gB analizowałam zarówno w komórkach ludzkich, jak i bydłych. gB BoHV-1, co prawda w mniejszym stopniu, dzieliła tendencję gB HSV-1 do wiązania cząsteczek MHC II (ludzkich lub bydłych), zmniejszając powierzchniowy poziom MHC II. Pod tym względem gB PRV wykazywało odmienną aktywność: przy wzroście poziomu MHC II na powierzchni, odnotowano zmniejszenie ilości ładunku HLA-DR w EVs. Grupa Niazy i wsp. wskazała na zwiększoną akumulację wczesno-endosomalną HLA-DR i HLA-DM w komórkach z ekspresją gB HSV-1 w porównaniu do komórek kontrolnych (Niazy i wsp., 2017). Chociaż w badaniach prowadzonych w naszym zespole nie wykazano zmian w endocytozie HLA-DR w komórkach MJS z gB BoHV-1 i HSV-1 (Grabowska i wsp., 2020), warto w przyszłości sprawdzić lokalizację podjednostek HLA-DR we wczesnych endosomach przy obecności

poszczególnych homologów gB, aby zbadać, czy istnieje korelacja pomiędzy stopniem nagromadzenia podjednostek HLA-DR/HLA-DM we wczesnych endosomach, a ich ilością obserwowaną w EVs. Bardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem dla zmian w poziomie MHC II może być ich opóźniony transport na powierzchnię związany z obecnością gB BoHV-1 i HSV-1, co również wykazano w Grabowska i wsp. (Grabowska i wsp., 2020).

Za duże osiągnięcie tej pracy uważam optymalizację metody otrzymywania frakcji wzbogaconych w EVs izolowanych przez ultrawierwienie w gradiencie jodoksanolu z supernatantów komórek zakażonych BoHV-1 i PRV. W metodzie tej wzorowałam się na pracy Deschamps i Kalamvoki (Deschamps i Kalamvoki, 2016), którzy opracowali podobny warsztat izolacji EVs w trakcie infekcji HSV-1. W pracy tej frakcje o mniejszej gęstości, które odpowiadały pęcherzykom, również zachowywały pewną infekcyjność, co świadczy o tym, że całkowite oddzielenie wirionów herpeswirusów od innych struktur pęcherzykowych wydzielanych przez komórki jest utrudnione, ze względu na podobne właściwości biofizyczne tych struktur. Deschamps i Kalamvoki nie badali obecności gB HSV-1 w EVs. W swojej pracy mogłam wykazać obecność gB HSV-1, BoHV-1 i PRV w EVs izolowanych z komórek zakażonych wirusem. Wykrywałam również niewielkie ilości innych wysoce immunogennych glikoprotein wirusowych, np. gD. Ponadto, EVs otrzymane z MJS zakażonych HSV-1, BoHV-1 i PRV zawierały cząsteczki HLA-DR. Markery EVs CD63 lub Alix oraz MHC II były wykrywalne w różnych ilościach w wielu frakcjach gradientu o niższej gęstości, co może sugerować wytwarzanie różnych populacji pęcherzyków, różniących się składem i/lub wielkością. W opublikowanej pracy Dogrommatzis i wsp. również potwierdzili obecność EVs uwalnianych w czasie infekcji HSV-1, które różniły się repertuarem tetraspanin (np. nie wszystkie zawierały CD63) i przenoszonym „cargó” (Dogrommatzis i wsp., 2021). Bardziej dokładną metodą do zbadania wielkości produkowanych pęcherzyków byłaby analiza śledzenia nanocząstek (NTA), ale w trakcie mojej pracy doktorskiej nie miałam możliwości jej wykorzystania.

Obecność gB BoHV-1 i/lub innych immunogennych glikoprotein (gB, gD i gC są głównymi immunogenami, wywołującymi u zakażonych zwierząt produkcję przeciwciał neutralizujących – Okazaki i wsp., 1986; Hariharan i wsp., 1991; Abdelmagid i wsp., 1995; Chowdhury, 1997) miało również potencjalne znaczenie biologiczne. Zaobserwałam, iż EVs zawierające gB BoHV-1 pochodzące z komórek linii stabilnej lub zakażonych BoHV-1 mogą wiązać przeciwciała surowicy koziej zdolnej do neutralizacji wirusa (uzyskanej na drodze

immunizacji zwierzęcia kompletną formą cząstki wirusowej), co sugeruje potencjał tych EVs do wychwytywania przeciwciał neutralizujących, tym samym osłabiający ich działanie. Jest to jeden z intensywnie badanych w ostatnim czasie wirusowych mechanizmów immunomodulacyjnych. Wśród udokumentowanych przykładów i prowadzonych badań znajdują się, m.in.: EVs zawierające antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (Meckes i Raab-Traub, 2011), EVs niosące na powierzchni białko S (ang. *spike*) wirusa SARS-CoV-2 (Troyer i wsp., 2021) czy pseudocząsteczki z powierzchnią obecnością glikoproteiny wirusa Ebola (Nehls i wsp., 2019). EVs-gB BoHV-1 pozytywne izolowane z linii stabilnych MJS i MDBK oraz frakcje EVs uwalnianych podczas infekcji BoHV-1 mogły skutecznie wiązać przeciwciała surowicy anty-BoHV-1 w teście ELISA. Zaobserwowane w pęcherzykach izolowanych z nadżerków komórek infekowanych występowanie innych glikoprotein alfa herpeswirusowych – gD, gE, gM – również o wysokim stopniu immunogenności, może wskazywać na podobny potencjał immunomodulacyjny tych EVs. Analogiczną aktywność odnotowano także dla pęcherzyków z gB i gH wirusa HCMV (Zicari i wsp., 2018).

Z kolei przeprowadzone przeze mnie obserwacje wychwytywania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z gB HSV-1 przez komórki ludzkiego raka wątroby wskazały na internalizację EVs z komórek MJS do komórek Huh7 zarówno w przypadku obecności lub braku gB HSV-1. gB HSV-1 wiąże komórkowe białko PILR $\alpha$ , pełniące rolę ko-receptora, występujące typowo na komórkach układu immunologicznego, takich jak: limfocyty B, komórki tuczne, komórki NK, monocyty, makrofagi i komórki dendrytyczne (Satoh i Arase, 2008; Umemura i wsp., 2021). Brak jest doniesień o występowaniu receptora PILR $\alpha$  na komórkach Huh7. Jednak gB może również wiązać powierzchnię komórek dzięki swojemu powinowactwu do siarczanu heparanu (Lycke i wsp., 1991), dlatego zdecydowałam się sprawdzić, czy obecność gB HSV-1 może wpływać pozytywnie na inkorporację EVs do komórek ssaczych. Pomiedzy mechanizmem i kinetyką inkorporacji obu typów EVs nie obserwowałam zdecydowanych różnic, chociaż wyniki wskazują na zwiększoną akumulację pęcherzyków MJS-gB HSV-1 w przedziale perinuklearnym komórki. Możliwe, iż do zbadania tej zdolności gB należałoby sprawdzić różne modele komórek docelowych (np. z nadekspresją genu PILR $\alpha$ ).

Uzyskane w pracy rezultaty podkreślają niektóre zachowane, a także zróżnicowane właściwości gB u wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV.

Wyniki wraz z wykazanim odmiennym wzorem oddziaływania dla poszczególnych

homologów gB alfa herpeswirusów z cząsteczkami MHC klasy II, nie do końca korelują z proponowanym w literaturze mechanizmem immunomodulacyjnym, zgodnie z którym MHC II w kompleksie z wirusową gB mogłyby być wyprowadzane na drodze nieznanego mechanizmu z ER i kierowane poza zainfekowaną komórkę w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (Sievers i wsp., 2002; Neumann i wsp., 2003, Temme i wsp., 2010; Niazy i wsp., 2017). W badaniach tych uzależniono aktywność gB od obecności w jej sekwencji aminokwasowej bardzo specyficznego motywu, w pełni homologicznego do miejsca wiązania MHC II z ludzkiego białka Ii. Dodatkowo, również na modelu linii komórek MJS stwierdzono, iż marker egzosomalny CD63 oddziałuje z cząsteczkami HLA-DR, regulując poziom tych białek w komórce (Hoorn i wsp., 2012). Zgodnie z eksperymentami przeprowadzonymi w niniejszej pracy, wszystkie trzy homologi gB znajdowały się w podobnej lokalizacji komórkowej wraz z białkami MHC II i CD63, co potwierdziła przeprowadzona dla tego typu testów analiza wartości współczynnika korelacji Pearsona. Obserwacje te są zgodne z wcześniejszym doniesieniem na temat przeprowadzonej analizy immunofluorescencyjnej przez grupę Niazy i wsp. o obecności HLA-DR we wczesnych endosomach na skutek interakcji z gB HSV-1 (Niazy i wsp., 2017). Teoria ta ma jednak wiele niewyjaśnionych aspektów, np. dane doświadczalne pokazujące, że kompleksy gB HSV-1/ HLA-DR we wczesnych endosomach nie pochodzą z procesu endocytozy z powierzchni komórki. W przypadku moich badań, zaobserwowałam jedynie częściową ko-lokalizację gB z markerem wczesnych endosomów EEA1, również w przypadku gB HSV-1. Ze względów technicznych nie było możliwe barwienie potrójne, które mogłoby pokazać ko-lokalizację we wczesnych endosomach również MHC II. Jak wykazałam, analizując sekwencje aminokwasowe trzech homologów gB, analogiczny motyw z łańcucha niezmiennego jest zlokalizowany w jednym z najmniej konserwowanych regionów tego białka. Dlatego można z jednej strony wnioskować, że przy tworzeniu kompleksu gB-MHC II istotne jest podobieństwo w sekwencji gB do motywu Ii (gB BoHV-1 zachowuje obecność reszt proliny) oraz bezpośrednie wiązanie, jak przedstawiono to dla gB HSV-1 (Sievers i wsp., 2002). Wyjaśnienie różnego wpływu homologów gB na poziom MHC II na powierzchni komórki oraz zdolności do wzajemnego oddziaływania tych białek być może wynika z niskiego stopnia konserwacji sekwencji tego konkretnego fragmentu wśród poszczególnych alfa herpeswirusowych homologów gB. Z drugiej strony, podobieństwo gB BoHV-1 jest tak marginalne, że sugeruje istnienie innych

mechanizmów wpływających na poziom MHC II. Interesującym byłoby sprawdzenie na podstawie testów *in silico*, czy sama struktura przestrzenna gB nie jest determinantą tego mechanizmu. HLA-DR jest uważane za marker EVs, co sugeruje, że nawet w warunkach fizjologicznych istnieje mechanizm ich inkorporacji do pęcherzyków. Niewątpliwie podczas każdej infekcji wirusowej możemy zaobserwować skumulowane efekty oddziaływania wielu komponentów wirusowych, a zatem, na poziom HLA-DR w trakcie infekcji może wpływać nie tylko gB. Dla przykładu – poza gB HSV-1 na szlak prezentacji antygenów za pomocą MHC II wpływają także produkty genów *UL41* (*vhs*), *US1* (Barcy i Corey, 2001; Trgovcich i wsp., 2002) i  $\gamma$ 34.5 (Trgovcich i wsp., 2002); *vhs* wykazują tę zależność także podczas infekcji BoHV-1 (Hinkley i wsp., 2000). Eksperymenty potwierdzające wyłączny wpływ gB na cząsteczki MHC II podczas infekcji mogłyby być przeprowadzone z wykorzystaniem wyciszenia genu gB w zainfekowanych komórkach, gdyż produkt tego genu należy do białek niezbędnych podczas cyklu replikacyjnego i nie można otrzymać wirusowego mutanta delecyjnego zdolnego do replikacji.

Otwartym pytaniem pozostaje – w jaki sposób gB jest kierowane do EVs? W oparciu o dane literaturowe na temat interferencji komórkowej tetraspaniny CD63 z białkami wirusowymi podczas infekcji (Fraile -Ramos i wsp., 2007; Hurwitz i wsp., 2017) oraz potwierdzone wieloma badaniami zaangażowanie i występowanie tego białka w późnych endosomach, lizosomach oraz MVBs zawierających ILVs uwalnianych jako egzosomy (Pols i Klumperman, 2009; Charrin i wsp., 2020; Momtaz i wsp., 2021), można sugerować, że CD63 jest zaangażowane w mechanizm sortowania gB do EVs. Jak zaobserwowano, CD63 pośredniczy w kierowaniu ładunku biologicznie czynnego do EVs zarówno w mechanizmach zależnych, jak i niezależnych od ESCRT (van Niel i wsp., 2011), a występowanie lub brak CD63 w komórce ma wpływ na ilość wydzielanych przez nią pęcherzyków (Hurwitz i wsp., 2017). Znany jest dobrze udokumentowany przykład białka LMP1 wirusa Epstein-Barr sortowanego do EVs przy udziale CD63 (Hurwitz i wsp., 2017; Hurwitz i wsp., 2018). Interakcja LMP1-CD63 wpływa na LMP1-zależną sygnalizację wewnątrzkomórkową oraz aktywację białek szlaków MAPK/ERK, NF- $\kappa$ B i mTOR, a także zmienia repertuar białek oddziałujących z CD63 (Cheerathodi i wsp., 2021). Badanie Dogrammatzis i wsp. wskazuje natomiast, że podczas infekcji HSV-1 obserwuje się zmniejszenie ilości wewnątrzkomórkowego białka CD63 z równoczesnym wzrostem zewnątrzkomórkowego CD63, a zakażone wirusem HSV-1 komórki uwalniają więcej

CD63-pozytywnych EVs niż komórki nieinfekowane (Dogrammatzis i wsp., 2019). Postuluje się, że CD63 negatywnie wpływa na infekcję HSV-1 a uwalnianie EVs CD63-pozytywnych poza zainfekowaną komórkę może kontrolować mechanizm rozprzestrzeniania się wirusa w organizmie gospodarza, gdyż sama egzocytoza CD63 wymaga replikacji wirusa (Dogrammatzis i wsp., 2019). Badania zawarte w niniejszej pracy wskazują na brak znaczących zmian w powierzchniowym poziomie CD63 w komórkach MJS z konstytutywną ekspresją genu gB, co wskazuje na brak interferencji z mechanizmem kierowania CD63 na powierzchnię błony plazmatycznej. Dalsze badania warto ukierunkować na zweryfikowanie możliwości oddziaływania i tworzenia, podobnie jak w przypadku LMP1, kompleksu gB-CD63, wykorzystując również komórki pozbawione ekspresji genu CD63.

Innym proponowanym mechanizmem kierowania gB do EVs może być występowanie w jego sekwencji specyficznych sekwencji sygnałowych, zaangażowanych w sortowanie białka do światła pęcherzyków. W przypadku białek Alix i CD63, są to późne domeny składania (ang. *late assembly (L)-domains*), biorące udział w wiązaniu wymienionych białek podczas formowania małych pęcherzyków błonowych znajdujących się wewnątrz ciał wielopęcherzykowych (ILV) (Baietti i wsp., 2012). Analizując *in silico* sekwencję aminokwasową gB zauważyłam, iż białko to zawiera zachowany pośród pozostałych herpeswirusów i wciąż niezbadany motyw LYP(L/I/V)X4L w domenie C-końcowej, przypominający ten występujący w późnych domenach L – LYPx(n)L/I. Z kolei sygnałem sortowania gB do EVs, sugerowanym przez Niazy i wsp., jest konserwowany w herpeswirusach motyw tyrozynowy YXXΦ, który w przypadku wirusa HSV-1 lokalizuje się w regionie <sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> (Niazy i wsp., 2017). Jednak ta sekwencja wydaje się działać pośrednio jako sygnał uwalniania gB z retikulum endoplazmatycznego do części *trans* aparatu Golgiego, jak wcześniej wykazano dla gB wirusów: HCMV i VZV (de Zarate i wsp., 2007; Heineman i wsp., 2006).

gB wirusów HSV-1, BoHV-1 i PRV wydaje się być dobrym modelem do badania mechanizmu kierowania ładunku biologicznie czynnego do EVs, ponieważ jej posttranslacyjne modyfikacje, takie jak N-glikozylacja, a także cięcie przez furynę (w przypadku BoHV-1 i PRV) związane z transportem białka do części *trans* aparatu Golgiego, pozwoliły ocenić status formy glikoproteiny obecnej w EVs. Detekcja wewnątrz EVs poszczególnych form gB: głównie gBb i gBc, przynajmniej częściowo odpornych na działanie EndoH, zatem posiadających dołączone reszty dojrzałych N-glikanów, pozwala wnioskować o obecności w EVs w pełni glikozylowanej

glikoproteiny, po przejściu przez część *trans* aparatu Golgiego.

Podczas infekcji wirusowej ingerowanie i wpływ na odpowiedź immunologiczną opisano także dla EVs biorących udział w dystrybucji biologicznie czynnego ładunku. Na przykład, dla wirusa HSV-1 modulacja funkcjonowania układu odpornościowego zachodzi poprzez transport w EVs wirusowego mikroRNA miR-H28 do niezainfekowanych komórek, co zwiększa ich podatność na infekcję wirusową (Deschamps i Kalamvoki, 2018). HSV-1 indukuje również kierowanie do EVs białka STING – sensora inicjującego transkrypcję genów komponentów białkowych odporności wrodzonej – co ma chronić zainfekowane komórki przed hamowaniem replikacji wirusa (Dogrammatzis i wsp., 2021). Podobny mechanizm wyprowadzania STING w EVs izolowanych z infekowanych limfocytów, opisano dla wirusa VZV. W tym przypadku zawartość EVs była uwalniana do neuronów; na tej podstawie postawiono hipotezę o uwzględnieniu tego mechanizmu jako sprzyjającego wykształceniu infekcji wirusowej latentnej (Gershon i Gershon, 2018).

Podczas swojej ewolucji herpeswirusy wykształciły szereg sposobów ingerowania w układ immunologiczny swojego gospodarza. Dokładniejsze poznanie cyklu replikacyjnego oraz każdy nowy opisany mechanizm immunomodulacyjny są ważne dla uzupełnienia i poszerzenia wiedzy na temat immunobiologii tych wirusów, co może pozytywnie wpływać na podejmowane działania terapeutyczne i profilaktyczne wobec tych patogenów. Przedstawione w tej pracy wyniki wskazują za zasadne podjęcie dalszych badań potencjału immunomodulacyjnego EVs z komórek infekowanych HSV-1, BoHV-1 lub PRV, za pośrednictwem przenoszenia aktywnego biologicznie „cargo”.



## 9 BIBLIOGRAFIA

1. **Abdel-Rahman O** (2019) Population-based validation of the National Cancer Comprehensive Network recommendations for baseline imaging workup of cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 29(1):53-58.
2. **Abdelmagid OY, Minocha HC, Collins JK, Chowdhury SI** (1995) Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. *Virology* 10;206(1):242-53.
3. **Abendroth A, Lin I, Slobedman B, Ploegh H, Arvin AM** (2001) Varicella-zoster virus retains major histocompatibility complex class I proteins in the Golgi compartment of infected cells. *J Virol* 75:4878–4888.
4. **Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F** (2005) Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* 15;65(10):4005-11.
5. **Alconada A, Bauer U, Baudoux L, Piette J, Hoflack B** (1998) Intracellular transport of the glycoproteins gE and gI of the varicella-zoster virus. gE accelerates the maturation of gI and determines its accumulation in the trans-Golgi network. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 13430-13436.
6. **Alconada A, Bauer U, Hoflack B** (1996) A tyrosine-based motif and a casein kinase II phosphorylation site regulate the intracellular trafficking of the varicella-zoster virus glycoprotein I, a protein localized in the trans-Golgi network. *EMBO J*, 15, 6096-6110.
7. **Alconada A, Bauer U, Sodeik B, Hoflack B** (1999) Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans Golgi network localization. *J Virol*, 73, 377-387.
8. **Altan-Bonnet N** (2016) Extracellular vesicles are the Trojan horses of viral infection. *Curr Opin Microbiol.* 32: 77–81.
9. **Ananda S, Samuela M, Kumarb S, Mathivanana S** (2019) Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. *BBA - Proteins and Proteomics* 1867 (2019) 140203.
10. **Atanasiu D, Whitbeck JC, Cairns TM, Reilly B, Cohen GH, Eisenberg RJ** (2007) Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 18718–18723.
11. **Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S, Tikoo SK** (1996) Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol.* 1996 Nov;53(1-2):31-42.
12. **Backovic M, Jardetzky TS** (2011) Class III viral membrane fusion proteins. *Adv Exp Med Biol.* 714:91-101.
13. **Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, David G** (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 3;14(7):677-85.
14. **Barcy S, Corey L** (2001) Herpes Simplex Inhibits the Capacity of Lymphoblastoid B Cell Lines to Stimulate CD4+ T Cells. *J Immunol* 15, 2001, 166 (10) 6242-6249.
15. **Brideau AD, Enquist LW, Tirabassi RS** (2000) The role of virion membrane protein endocytosis in the herpesvirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 17:69-82.
16. **Bryant NA, Davis-Poynter N, Vanderplasschen A, Alcamì A** (2003) Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO J*, 22, 833-846.
17. **Cairns TM, Sarah A, Connolly SA** (2021) Entry of Alphaherpesviruses. *Curr Issues Mol Biol* 41:63-124.
18. **Calistri A, Sette P, Salata C, Cancellotti E, Forghieri C, Comin A, Goettlinger H, Campadelli-Fiume G, Palu G, Parolin C** (2007) Intracellular Trafficking and Maturation of Herpes Simplex Virus Type 1 gB and Virus Egress Require Functional Biogenesis of Multivesicular Bodies. *J Virol*, p. 11468–11478.
19. **Carpentier JL i wsp.** (1982) Co-localization of 125I-epidermal growth factor and ferritin-low density lipoprotein in coated pits: a quantitative electron microscopic study in normal and mutant human fibroblasts. *J Cell Biol.* 95(1):73–7.
20. **Castellino F, Zhong G, Germain RN** (1997) Antigen Presentation by MHC Class II Molecules: Invariant Chain Function, Protein Trafficking, and the Molecular Basis of Diverse Determinant Capture. *Human Immunology* 54, 159–169
21. **Charrin S, Palmulli R, Billard M, Clay D, Boucheix C, Van Niel G, Rubinstein E** (2020) Rapid Isolation of Rare Isotype-Switched Hybridoma Variants: Application to the Generation of IgG2a and IgG2b MAb to CD63, a Late Endosome and Exosome Marker. *Antibodies (Basel)* 2;9(3):29.

22. **Cheerathodi M, Nkosi D, Cone AS, York SB, Meckes Jr DG** (2021) Epstein-Barr Virus LMP1 Modulates the CD63 Interactome. *Viruses* 15;13(4):675.
23. **Chiriaco MS, Bianco M, Nigro A, Primiceri E, Ferrara F, Romano A, Quattrini A, Furlan R, Arima V, Maruccio G** (2018) Lab-on-Chip for Exosomes and Microvesicles Detection and Characterization. *Sensors* 2018, 18, 3175.
24. **Chouljenko VN, Iyer AV, Chowdhury S, Chouljenko DV, Kousoulas KG** (2009) The Amino Terminus of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein K (gK) Modulates gB-Mediated Virus-Induced Cell Fusion and Virion Egress. *J Virol*, p. 12301–12313.
25. **Chowdhury SI** (1997) Fine mapping of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein C neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and synthetic peptides. *Vet Microbiol* 58(2-4):309-14.
26. **Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, Emanuelli C, Gasecka A i wsp.** (2017) Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circulation Research* 1632-1648.
27. **Crump CM, Xiang Y, Thomas L, Gu F, Austin C, Tooze SA, Thomas G** (2001) PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. *EMBO J*, 20 (9):2191-2201.
28. **De Pelsmaecker S, Dierick E, Klupp B, Mettenleiter TC, Cantoni C, Vitale M, Favoreel HW** (2019) Expression of the pseudorabies virus gB glycoprotein triggers NK cell cytotoxicity and increases binding of the activating NK cell receptor PIRB. *J. Virol.* 93, e02107-18.
29. **de Toledo Martins S, Alves LR** (2020) Extracellular Vesicles in Viral Infections: Two Sides of the Same Coin? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:593170.
30. **de Zarate IBO, Cantero-Aguilar L, Longo M, Berlioz-Torrent C, Rozenberg F** (2007) Contribution of Endocytic Motifs in the Cytoplasmic Tail of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein B to Virus Replication and Cell-Cell Fusion. *J Virol*, 81 (24):13889-13903.
31. **Dechamps i Kalamvoki** (2016) Extracellular vesicles during Herpes Simplex Virus type 1 infection: an inquire. *J Virol* 5;13:63.
32. **Deschamps T, Kalamvoki M** (2018) Extracellular Vesicles Released by Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells Block Virus Replication in Recipient Cells in a STING-Dependent Manner. *J Virol* 29;92(18):e01102-18.
33. **Dogrammatzis C, Deschamps T, Kalamvoki M** (2019) Biogenesis of Extracellular Vesicles during Herpes Simplex Virus 1 Infection: Role of the CD63 Tetraspanin. *J Virol* 4;93(2):e01850-18.
34. **Dogrammatzis C, Saleh S, Deighan C, Kalamvoki M** (2021) Diverse Populations of Extracellular Vesicles with Opposite Functions during Herpes Simplex Virus 1 Infection. *J Virol* 24;95(6):e02357-20.
35. **Dogrammatzis C, Saleh S, Deighan C, Kalamvoki M.** (2021) Diverse Populations of Extracellular Vesicles with Opposite Functions during Herpes Simplex Virus 1 Infection. *J Virol.* 24;95(6):e02357-20.
36. **Dutta D, Donaldson JG** (2015) Rab and Arf G Proteins in Endosomal Trafficking. *Methods Cell Biol.* 130: 127–138.
37. **Elkin SR, Lakoduk AM, Schmid SL** (2016) Endocytic Pathways and Endosomal Trafficking: A Primer. *Wien Med Wochenschr.* 166(7-8): 196–204.
38. **Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW, Smith GA** (1998) Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* 51:237-347.
39. **Fabbiano F, Corsi J, Gurrieri E, Trevisan C, Notarangelo M, D'Agostino VG** (2020) RNA packaging into extracellular vesicles: An orchestra of RNA-binding proteins? *J Extracell Vesicles*, 10:e12043.
40. **Falanga A, Tarallo R, Vitiello G, Vitiello M, Perillo E, Cantisani M, D'Errico G, Galdiero M, Galdiero S** (2012) Biophysical Characterization and Membrane Interaction of the Two Fusion Loops of Glycoprotein B from Herpes Simplex Type I Virus. *PLoS ONE* 7(2): e32186.
41. **Fan Z, Grantham ML, Smith MS, Anderson ES, Cardelli JA, Muggeridge MI** (2002) Truncation of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B increases its cell surface expression and activity in cell-cell fusion, but these properties are unrelated. *J Virol*, 76 (18):9271-9283.
42. **Favoreel HW** (2006) The why's of Y-based motifs in alphaherpesvirus envelope proteins. *Virus Research*, 117:202-208.
43. **Favoreel HW, Van Minnerbruggen G, Nauwynck HJ, Enquist LW, Pensaert MB** (2002) A tyrosine-based motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein B is important for both antibody-induced internalization of viral glycoproteins and efficient cell-to-cell spread. *J Virol*, 76 (13):6845-6851.
44. **Ficińska J, Van Minnebruggen G, Nauwynck HJ, Bieńkowska-Szewczyk K, Favoreel HW** (2005) Pseudorabies glycoprotein D contains a functional endocytosis motif that acts in concert with an endocytosis motif in gB to drive internalization of antibody-antigen complex from the surface of infected monocytes. *J Virol* , 79 (11):7248-7254.

45. **Fraille-Ramos A, Pelchen-Matthews A, Risco C, Rejas MT, Emery VC, Hassan-Walker AF, Esteban M, Marsh M** (2007) The ESCRT machinery is not required for human cytomegalovirus envelopment *Cell Microbiol* 9(12):2955-67.
46. **Galdiero S, Vitiello M, D'Isanto M, Falanga A, Cantisani M, Browne H, Pedone C, Galdiero M** (2008) The Identification and Characterization of Fusogenic Domains in Herpes Virus Glycoprotein B Molecules. *ChemBioChem* 2008,9,758 – 767.
47. **Garstka MA, Neefjes J.** (2013) How to target MHC class II into the MIIC compartment. *Mol Immunol.* 55(2):162-5.
48. **Gershon M, Gershon A** (2018) Varicella-Zoster Virus and the Enteric Nervous System. *J Infect Dis* 22;218(suppl\_2):S113-S119.
49. **Grabowska AK, Lipińska AD, Rohde J, Szewczyk B, Bienkowska-Szewczyk K, Rziha HJ** (2009) New baculovirus recombinants expressing Pseudorabies virus (PRV) glycoproteins protect mice against lethal challenge infection. *Vaccine.* 2;27(27):3584-91.
50. **Grabowska K, Wąchalaska M, Graul M, Rychłowski M, Bieńkowska-Szewczyk K, Lipińska AD** (2020) Alphaherpesvirus gB Homologs Are Targeted to Extracellular Vesicles, but They Differentially Affect MHC Class II Molecules. *Virus* 10;12(4):429.
51. **Graul M** (2019) Modułacja odpowiedzi immunologicznej podczas infekcji herpeswirusem - molekularne aspekty działania kompleksu białek UL49.5/gM wirusa BHV-1. Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów, MWB UG-GUMed.
52. **Griffin BD, Verweij MC, Wiertz EJHJ** (2010) Herpesviruses and immunity: The art of evasion. *Vet Microbiol* 143:89-100.
53. **Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas EI** (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* (2011) 68:2667–2688.
54. **Hampfl H, Ben-Porat T, Ehrlicher L, Habermehl KO, Kaplan AS** (1984) Characterization of the envelope proteins of pseudorabies virus. *J Virol.* 1984 Nov;52(2):583-90.
55. **Harder T, Simons K.** (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol.* 9(4):534–42.
56. **Hariharan K, Hariharan MJ, Zamb TJ, Krueger KR, Srikumaran S** (1991) Bovine monoclonal anti-idiotypes induce antibodies specific for a synthetic peptide bearing a neutralizing epitope of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gI (gB). *J Immunol* 15;146(10):3489-95.
57. **Heineman TC, Hall SL** (2001) VZV gB endocytosis and Golgi localization are mediated by YXXphi motifs in its cytoplasmic domain. *Virology* 20;285(1):42-9.
58. **Heineman TC, Schleiss M, Bernstein DI, Spaete RR, Yan L, Duke G, Prichard M, Wang Z, Yan Q, Sharp MA, Klein N, Arvin AM, Kemble G** (2006) A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J Infect Dis* 15;193(10):1350-60.
59. **Hinkley S, Ambagala AP, Jones CJ, Srikumaran S** (2000) A vhs-like activity of bovine herpesvirus-1. *Arch Virol.* 2000;145(10):2027-46.
60. **Hoferer M, Braun A, Sting R.** (2017) Creation of a bovine herpes virus 1 (BoHV-1) quantitative particle standard by transmission electron microscopy and comparison with established standards for use in real-time PCR. *Biologicals.* 48:121-125.
61. **Huemer HP, Larcher C, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA** (1993) Species selective interaction of Alphaherpesvirinae with the "unspecific" immune system of the host. *Archives of Virology* 130, 353-364.
62. **Hughes HP, Campos M, McDougall L, Beskorwayne TK, Potter AA, Babiuk LA.** (1994) Regulation of major histocompatibility complex class II expression by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun.* 62(5):1609-15.
63. **Hurley JH, Odorizzi G** (2012) Get on the exosome bus with ALIX. *NATURE CELL BIOLOGY* vol. 14 NUMBER 7:654-655.
64. **Hurwitz SN, Cheerathodi MR, NkosivD, York SB, Meckes Jr DG** (2018) Tetraspanin CD63 Bridges Autophagic and Endosomal Processes To Regulate Exosomal Secretion and Intracellular Signaling of Epstein-Barr Virus LMP1. *J Virol* 92:e01969-17.
65. **Hurwitz SN, Nkosi D, M Conlon MM, York SB, Liu X, Tremblay DC, Meckes Jr DG** (2017) CD63 Regulates Epstein-Barr Virus LMP1 Exosomal Packaging, Enhancement of Vesicle Production, and Noncanonical NF-κB Signaling *J Virol* 14;91(5):e02251-16.
66. **Kalra H, Simpson RJ i wsp.** (2012) Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol* 10(12): e1001450.

67. **Kelly BT, McCoy AJ, Spate K, Miller SE, Evans PR, Honing S, Owen DJ** (2008) A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* 456, 976–979.
68. **Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ i wsp.** (2015) EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*, 31(6), 2015, 933–939.
69. **Khan J, Zimmermann A, Basler M, Groettrup M, Hengel H.** (2004) A Cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. *J Virol* 78:1831-1842.
70. **Kiss AL, Botos E** (2009) Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J. Cell. Mol. Med.* Vol 13, No 7, 2009 pp. 1228-1237.
71. **Koppers-Lalic D, Rijsewijk FAM, Verschuren SBE, van Gaans-van den Brink JAM, Neisig A, Rensing ME, Neefjes J, Wiertz EJHJ** (2001) The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. *Journal of General Virology* (2001), 82, 2071–2081.
72. **Koppers-Lalic D, Reits EA, Rensing ME, Lipińska AD, Abele R, Koch J, Marcondes Rezende M, Admiraal P, van Leeuwen D, Bieńkowska-Szewczyk K, Mettenleiter TC, Rijsewijk FA, Tampe R, Neefjes J, Wiertz EJ** (2005) Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *PNAS* 102, 5144-5149.
73. **Koppers-Lalic D, Verweij MC, Lipińska AD, Wang Y, Quinten E, Reits EA, Koch J, Loch S, Marcondes Rezende M, Daus F, Bieńkowska-Szewczyk K, Osterrieder N, Mettenleiter TC, Heemskerk MHM, Tampé R, Neefjes JJ, Chowdhury SI, Rensing ME, Rijsewijk FAM, Wiertz EJHJ** (2008) Varicellovirus UL49.5 Proteins Differentially Affect the Function of the Transporter Associated with Antigen Processing, TAP. *PLOS Pathogens* 4(5): e1000080.
74. **Liu L, Zhou Q, Xie Y, Zuo L, Zhu F, Lu J** (2017) Extracellular vesicles: novel vehicles in herpesvirus infection. *VIROLOGICA SINICA* 2017, 32 (5): 349–356.
75. **Lobanov VA, Zheng C, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S** (2010) Intracellular trafficking of VP22 in bovine herpesvirus-1 infected cells. *Virology*. 20;396(2):189-202.
76. **Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, i wsp.** (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 3:26913.
77. **Lycke E, Johansson M, Svennerholm B, Lindahl U** (1991) Binding of herpes simplex virus to cellular heparan sulfate, an initial step in the adsorption process. *J Gen Virol.* 72:1131–1137.s
78. **Maclachlan NJ, Dubovi EJ** (2011) Fenner's Veterinary Virology. 4th Edition. eBook ISBN: 9780123751591. Hardcover ISBN: 9780123751584. Imprint: Academic Press 26.11.2010.
79. **Manservigi R, Cassai E** (1991) The glycoproteins of the human herpesviruses. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 14, 81-95.
80. **Matschulla T, Berry R, Gerke C, Döring M, Busch J, Paijo J, Kalinke U, Momburg F, Hengel H, Halenius A** (2017) A highly conserved sequence of the viral TAP inhibitor ICP47 is required for freezing of the peptide transport cycle. *Scientific Reports* 7:2933.
81. **McGeoch, DJ, Davison AJ, Dolan A, Gatherer D, Sevilla-Reyes EE** (2008) Molecular evolution of the Herpesvirales. In: *Origin and Evolution of Viruses*, 2nd edn (E. Domingo, C.R. Parrish and J.J. Holland, Eds.), Elsevier, London, pp. 447–475
82. **Meckes DG, Raab-Traub N** (2011) Microvesicles and viral infection. *J Virol* 85(24):12844-54.
83. **Mettenleiter TC** (2002) Herpesvirus Assembly and Egress. *J Virol*, 76 (4):1537-1547.
84. **Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H** (2009) Herpesvirus assembly: an update. *Virus Research* 143 (2):224-234.
85. **Mettenleiter TC** (2000) Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis--state of the art, June 1999. *Vet Res* 31(1):99-115.
86. **Molloy SS, Thomas L, Van Slyke JK, Stenberg PE, Thomas G** (1994) Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.*13:18-33.
87. **Momtaz S, Molina B, Mlera L, Goodrum F, Wilson JM** (2021) Cell type-specific biogenesis of novel vesicles containing viral products in human cytomegalovirus infection. *J Virol* 24;JV1.02358-20.
88. **Morgenstern JP, Land H** (1990) Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* 25;18(12):3587-96.
89. **Mori Y, Koike M, Moriishi E, Kawabata A, Tang H, Oyaizu H, Uchiyama Y, Yamanishi K** (2008) Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic* 9(10):1728-42.

90. **Muggeridge MI** (2012) Glycoprotein B of Herpes Simplex Virus 2 Has More than One Intracellular Conformation and Is Altered by Low pH. *J Virol*, 86, 12, p. 6444–6456.
91. **Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF** (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*, 3: 24641.
92. **Murata M. i wsp.** (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(22):10339–43.
93. **Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E** (2007) Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research* 38:181-209.
94. **Ndjamen B, Farley AH, Lee T, Fraser SE, Bjorkman PJ** (2014) The herpes virus Fc receptor gE-gI mediates antibody bipolar bridging to clear viral antigens from the cell surface. *PLoS Pathog.* 10(3):e1003961.
95. **Neumann J, Eis-Hübinger AM, Koch N** (2003) Herpes simplex virus type 1 targets the MHC class II processing pathway for immune evasion. *J Immunol* 171(6):3075-83.
96. **Neutra MR, i wsp.** (1985) Intracellular transport of transferrin- and asialoorosomuroid-colloidal gold conjugates to lysosomes after receptor-mediated endocytosis. *J Histochem Cytochem.* 33(11):1134–44.
97. **Niazy N, Temme S, Bocuk D, Giesen C, König A, Temme N, Ziegfeld A, Gregers TF, Bakke O, Lang T, Eis-Hübinger AM, Koch N** (2017) Misdirection of endosomal trafficking mediated by herpes simplex virus-encoded glycoprotein B. *FASEB J* 31(4):1650-1667.
98. **Okazaki K, Honda E, Minetoma T, Kumagai T** (1986) Mechanisms of neutralization by monoclonal antibodies to different antigenic sites on the bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *Virology* 150(1):260-4.
99. **Olson JK, Grose C** (1997) Endocytosis and recycling of varicella-zoster virus Fc receptor glycoprotein gE: internalization mediated by a YXXL motif in the cytoplasmic tail. *J Virol* 71(5):4042-54.
100. **Park B, Kim Y, Shin J, Lee S, Cho K, Früh K, Lee S, Ahn K** (2004) Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent peptide loading and optimization of the MHC class I peptide cargo for immune evasion. *Immunity*, 20:71-85.
101. **Parton RG, del Pozo MA** (2013) Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(2):98–112.
102. **Parton RG, Simons K** (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(3):185–94.
103. **Pasiaka TJ, Maresova L, Grose C** (2003) A functional YNKI motif in the short cytoplasmic tail of varicella-zoster virus glycoprotein gH mediates clathrin-dependent and antibody -independent endocytosis. *J Virol*, 77, 4191-4204.
104. **Pawliczek T, Crump CM** (2009) Herpes simplex virus type 1 production requires a functional ESCRT-III complex but is independent of TSG101 and ALIX expression. *J Virol* 83(21):11254-64.
105. **Philly JV, Kannan A, Dasgupta S** (2015) MDA-9/Syntenin Control. *J. Cell. Physiol.* 231: 545–550.
106. **Piedade D, Azevedo-Pereira JM** (2016) The Role of microRNAs in the Pathogenesis of Herpesvirus Infection. *Viruses* 8, 156.
107. **Piper RC, Katzmann DJ** (2007) Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23: 519–547.
108. **Pols MS, Klumperman J** (2009) Trafficking and function of the tetraspanin CD63 *Exp Cell Res* 15;315(9):1584-92.
109. **Raposo G, Stoorvogel W** (2013) Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* Vol. 200 No. 4 373–383.
110. **Rauh I, Mettenleiter TC** (1991) Pseudorabies virus glycoproteins gII and gp50 are essential for virus penetration. *J Virol* 65(10):5348-56.
111. **Reyburn HT, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Pazmany L, Strominger JL.** 1997. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 386:514–517.
112. **Roizman B, Pellett PE** (2001) The family *Herpesviridae*: a brief introduction. Chapter 71, DM Knipe, PM Howley, eds. *Fields' Virology*, Edition 4, Volume 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2381-2397.
113. **Royle SJ** (2006) The cellular functions of clathrin. *Cell Mol Life Sci.* 63(16): 1823–1832.
114. **Saira K, Jones C** (2006) BHV-1 gene encoding infected cell protein (ICP0) inhibits antiviral signaling by inducing IRF3 degradation. 31st International Herpesvirus Workshop, Seattle, abstract 8.39.
115. **Satoh T, Arii J, Suenaga T, Wang J, Kogure A, Uehori J, Arase N, Shiratori I, Tanaka S, Kawaguchi Y i wsp.** (2008) PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell*, 132, 935–944.
116. **Satoh T, Arase H** (2008) HSV-1 infection through inhibitory receptor, PILRalpha. *Uirusu* 58(1):27-36.

117. **Schröder B** (2016) The multifaceted roles of the invariant chain CD74 — More than just a chaperone. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863 (2016) 1269–1281.
118. **Schuren ABC, Costa AI, Wiertz EJHJ** (2016) Recent advances in viral evasion of the MHC Class I processing pathway. *Curr Opin Immunol* 40:43-50.
119. **Schwytzer M, Paces V, Letchworth GJ, Misra V, Buhk HJ, Lowery DE, Simard C, Bello LJ, Thiry E, Vlcek C** (1997) Complete DNA sequence of bovine herpesvirus 1, National Center for Biotechnology Information (NCBI) Nucleotide Database Accession No NC\_001847.
120. **Shao H, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H** (2018) New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev.* 28; 118(4): 1917–1950.
121. **Sievers E, Neumann J, Raftery M, Schoenrich G, Eis-Hübinger AM, Koch N** (2002) Glycoprotein B from strain 17 of herpes simplex virus type I contains an invariant chain homologous sequence that binds to MHC class II molecules. *Immunology* 107 129–135.
122. **Spencer JV, Lockridge KM, Barry PA, Lin G, Tsang M, Penfold MET, Schall TJ.** (2002) Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* 76: 1285-1292.
123. **Temme S, Eis-Hübinger AM, McLellan AD, Koch N** (2010) The Herpes Simplex Virus-1 Encoded Glycoprotein B Diverts HLA-DR into the Exosome Pathway. *J Immunol* 2010; 184:236-243.
124. **Théry C, Witwer KW i wsp.** (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 7, 1535750.
125. **Tikoo SK, Campos M, Babiuk LA** (1995) Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Advances in Virus Research*, 45, 191-223.
126. **Tirabassi RS, Enquist LW** (2000) Role of the pseudorabies virus gI cytoplasmic domain in neuroinvasion, virulence, and posttranslational N-linked glycosylation. *J Virol*, 74, 3505-3516.
127. **Tomazin R, van Schoot NEG, Goldsmith K, Jugovic P, Sempe P, Früh K, Johnson DC** (1998) Herpes simplex virus type 2 ICP47 inhibits human TAP but not mouse TAP. *J Virol* 72(3):2560-2563.
128. **Trgovcich J, Johnson D, Roizman B** (2002) Cell surface major histocompatibility complex class II proteins are regulated by the products of the gamma (1)34.5 and U(L)41 genes of herpes simplex virus 1. *J Virol* 76(14):6974-86.
129. **Troyer Z, Najwa Alhusaini N, Tabler CO, Sweet T, de Carvalho KIL, Schlatzer DM, Carias L, King CL, Matreyek K, Tilton JC** (2021) Extracellular vesicles carry SARS-CoV-2 spike protein and serve as decoys for neutralizing antibodies. *J Extracell Vesicles* 10(8):e12112.
130. **Tucci M, Mannavola F, Passarelli A, Stucci LS, Cives M, Silvestris F** (2018) Exosomes in melanoma: a role in tumor progression, metastasis and impaired immune system activity. *Oncotarget.* 9(29):20826-20837.
131. **Turin L, Russo S, Poli G** (1999) BHV-1: New molecular approaches to control a common and widespread Infection. *Mol Med* 5:261-284.
132. **Wenske EA, Bratton MW, Courtney RJ** (1982) Endo-beta-N-acetylglucosaminidase H sensitivity of precursors to herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB and gC. *J. Virol.* 44, 241–248.
133. **Umemura T, Joshita S, Saito H, Wakabayashi S, Kobayashi H, Yamashita Y, Sugiura A, Yamazaki T, Ota, M** (2021) Investigation of the Effect of KIR–HLA Pairs on Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis C Virus Cirrhotic Patients. *Cancers* 13, 3267.
134. **Vallbracht M, Brun D, Tassinari M, Vaney MC, Pehau-Arnaudet G, Guardado-Calvo P, Haouz A, Klupp BG, Mettenleiter TC, Rey FA, Backovic M** (2017) Structure-Function Dissection of Pseudorabies Virus Glycoprotein B Fusion Loops. *J Virol* 92:e01203-17.
135. **van de Weijer ML, Luteijn RD, Wiertz EJHJ** (2015) Viral immune evasion: Lessons in MHC class I antigen presentation. *Semin Immunol* 27:125-137.
136. **van den Hoorn T, Paul P, Janssen L, Janssen H, Neeffjes J** (2012) Dynamics within tetraspanin pairs affect MHC class II expression *J Cell Sci* 15;125(Pt 2):328-39.
137. **van Deun J, Hendrix A.** (2017) Is your article EV-TRACKed? *J Extracell Vesicles.* 6(1):1379835.
138. **van Deun J, Mestdagh P, Agostinis P, i wsp.** (2017) EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods* 28;14(3):228–232.
139. **van Dongen HM, Masoumi N, Witwer KW, Michiel Pegtel DM** (2016) Extracellular Vesicles Exploit Viral Entry Routes for Cargo Delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:369-386.
140. **Van Lith, M, van Ham M, Griekspoor A, Tjin E, Verwoerd D, Calafat J, Janssen H, Reits E, Pastroors L, Neeffjes J** (2001) Regulation of MHC Class II Antigen Presentation by Sorting of Recycling HLA-DM/DO and Class II within the Multivesicular Body. *J. Immunol.* 167, 884–892.

141. **van Niel G, D'Angelo G, Raposo G** (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(4):213-228.
142. **van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, Marks MS, Rubinstein E, Raposo G** (2011) The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 18;21(4):708-21.
143. **Verderio C, Gabrielli M, Giussani P** (2018) Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles. *Journal of Lipid Research* vol. 59:1325-1340.
144. **Verweij MC, Horst D, Griffin BD, Luteijn RD, Davison AJ, Rensing ME, Wiertz EJHJ** (2015) Viral inhibition of the transporter associated with antigen processing (TAP): A striking example of functional convergent evolution. *PLOS Pathog* 11(4):e1004743.
145. **Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M** (2014) Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol.* 2014 October ; 28: 3–13.
146. **Vollmer B, Grünewald K** (2020) Herpesvirus membrane fusion - a team effort. *Curr Opin Struct Biol*, 62:112-120.
147. **Wandinger-Ness A, Zerial M** (2014) Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal System. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6:a022616.
148. **Weir JP** (2001) Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* 27;271(2):117-30.
149. **Williams RL, Urbé S** (2007) The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 8:355-368.
150. **Winkler MT, Doster A, Jones C** (1999) Bovine herpesvirus can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle, *J Virol*, 73, 8657-8668.
151. **Witwer KW i wsp.** (2017) Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility. *J Extracell Vesicles*, 6, 1396823.
152. **Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-’t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Johan Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F** (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*, 2:1, 20360.
153. **Witwer KW, Théry C** (2019) Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *J Extracell Vesicles*, 8, 1648167.
154. **Wölfer U, Kruft V, Sawitzky D, Hampl H, Wittmann-Liebold B, Habermehl KO** (1990) Processing of pseudorabies virus glycoprotein gII. *J Virol* ;64(6):3122-5.
155. **Yamada E** (1995) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol.* 1(5):445–58.
156. **Zeev-Ben-Mordehai T, Vasishtan D, Hernández Durán A, Vollmer B, White P, Pandurangan AP, Siebert CA, Topf M, Grünewald K** (2016) Two distinct trimeric conformations of natively membrane-anchored full-length herpes simplex virus 1 glycoprotein B. *PNAS* vol. 113 no. 15: 4176–4181.
157. **Zicari S, Arakelyan A, Ñahui Palomino RA, Fitzgerald W, Vanpouille C, Lebedeva A, Schmitt A, Bomsel M, Britt W, Margolis L** (2018) Human cytomegalovirus-infected cells release extracellular vesicles that carry viral surface proteins. *Virology* 524:97-105.
158. **Zuo J, Currin A, Griffin BD, Shannon-Lowe C, Thomas WA, Rensing ME, Wiertz EJHJ, Rowe M** (2009) The Epstein-Barr virus G-protein coupled receptor contributes to immune evasion by targeting MHC class I molecules for degradation. *PLoS Pathog* 5:e1000255.

#### Strony internetowe:

<https://www.addgene.org/1764>  
[https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif\\_scan](https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif_scan)  
<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>  
<https://technelysium.com.au/wp/>  
<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

## 10 MATERIAŁY DODATKOWE – FILMY Z MIKROSKOPOWEGO ZAPISU POKLATKOWEGO TESTU WYCHWYTYWANIA PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH -gB HSV-1 POZYTYWNYCH PRZEZ KOMÓRKI SSACZE Huh7

	<i>Plik MOV</i>	<i>charakterystyka</i>
<b>1</b>	Huh7_plus_EVs_MJS_PKH67-znakowane_3h_Processed001	Komórki analizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8X wyposażonego w komorę środowiskową, przy zachowaniu temperatury 37°C i atmosfery nasyconej CO <sub>2</sub> do 5%. Obrazy rejestrowano co 30 sekund przez 3, 6 lub 15 godzin. Dodano obrazy wykonane w świetle przechodzącym dla wizualizacji morfologii komórek. Relatywny czas obrazowania wyświetlany jest w prawym dolnym rogu obrazu.
<b>2</b>	Huh7_plus_EVs_MJS_PKH67-znakowane_6h_Processed001	
<b>3</b>	Huh7_plus_EVs_MJS_PKH67-znakowane_15h_Processed001	
<b>4</b>	Huh7_plus_EVs_MJS gB_HSV-1_PKH67-znakowane_3h_Processed001	
<b>5</b>	Huh7_plus_EVs_MJS gB_HSV-1_PKH67-znakowane_6h_Processed001	
<b>6</b>	Huh7_plus_EVs_MJS gB_HSV-1_PKH67-znakowane_15h_Processed001	