

Małgorzata Graul

Modulacja odpowiedzi immunologicznej podczas infekcji herpeswirusem - molekularne aspekty działania kompleksu białek UL49.5/gM wirusa BHV-1

Bydlęcy herpeswirus 1 (BHV-1, BoHV-1) jest szeroko rozpowszechnionym patogenem bydła, stanowiącym przyczynę znacznych strat finansowych w hodowli bydła. Przez bliskie pokrewieństwo z takimi ludzkimi wirusami, jak wirus ospy wietrznej i półpaśca (VZV) i wirus opryszczki (HSV-1), jest dobrym i bezpiecznym modelem do badania przebiegu infekcji herpeswirusowej.

Herpeswirusy, które pozostają w zakażonych organizmach przez ich całe życie, rozwinęły różnorodne strategie unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Jedną z nich jest ingerencja w prezentację peptydów antygenowych poprzez białka układu zgodności tkankowej (MHC). Głównym obiektem badań w tej pracy było białko UL49.5 – kluczowy czynnik immunomodulacyjny wirusa BHV-1 i innych spokrewnionych z nim przedstawicieli rodzaju *Varicellovirus*. Białko to obniża ilość cząsteczek MHC klasy I na powierzchni komórek infekowanych i tym samym utrudnia ich rozpoznanie przez limfocyty T cytotoksyczne (CTL). UL49.5 blokuje aktywność transportera związanego z przetwarzaniem antygeny (TAP), który odpowiada za translokację peptydów antygenowych z cytoplazmy do retikulum endoplazmatycznego (ER), gdzie dochodzi do ich związania z dojrzewającymi cząsteczkami MHC I.

UL49.5 BHV-1 to małe białko transbłonowe typu I, zbudowane z N-końcowej domeny znajdującej się w ER, regionu transbłonowego oraz domeny cytoplazmatycznej. UL49.5 występuje w zakażonej komórce w dwóch głównych formach: monomerycznej oraz w kompleksie z drugim białkiem wirusowym – glikoproteiną M (gM). Tworzenie kompleksu reguluje aktywność obu białek, najprawdopodobniej poprzez ich współzależność w prawidłowym fałdowaniu, uwalnianiu z ER oraz wewnątrzkomórkowym transporcie. Niezwiązana z gM forma UL49.5 podlega retencji w ER, gdzie blokuje aktywność transportera TAP oraz kieruje jego podjednostki do degradacji. Dojrzały kompleks uczestniczy, m.in., w dojrzewaniu wirionów oraz w rozprzestrzenianiu się wirusa zgodnie z mechanizmem „*cell-to-cell spread*”.

Celem mojej pracy doktorskiej było określenie molekularnego mechanizmu funkcjonowania kompleksu białek UL49.5 i gM BHV-1 w dwóch, niezbadanych dotąd aspektach. Pierwszym było znalezienie, na podstawie modelu strukturalnego, sekwencji aminokwasowych i/lub specyficznych motywów strukturalnych w N-końcowej domenie UL49.5, odpowiedzialnych za blokowanie transportera TAP i indukcję jego degradacji. Analizie podlegały m. in. reszty aminokwasów obdarzonych ładunkiem, zdolne do tworzenia mostków solnych oraz reszty proliny warunkujące tworzenie β -zgięcia w strukturze białka. Mutacje poszczególnych kodonów genu UL49.5 wprowadzono za pomocą reakcji mutagenyzy miejscowo-specyficznej. Natomiast funkcjonalność wariantów białek

badano w liniach komórek ludzkiego czerniaka (MJS) produkujących w sposób konstytutywny badane białka lub podczas infekcji komórek MJS oraz embrionalnych komórek nerki bydlęcej MDBK skonstruowanymi mutantami wirusa BHV-1. Wykazano, że N-terminalne reszty proliny UL49.5 są niezbędne do efektywnego blokowania transportera TAP a ich substytucje skutkowały zmianami w całej strukturze UL49.5. W tym aspekcie potwierdziła się hipoteza o zależności aktywności UL49.5 od określonych motywów strukturalnych. Zmiany reszt aminokwasów obdarzonych ładunkiem w N-końcowej domenie UL49.5 skutkowały zmniejszoną degradacją transportera, sugerując ważną rolę mostków solnych w utrzymaniu konformacji białka i/lub interakcji z TAP. Podjęłam również próbę identyfikacji komórkowego białka zaangażowanego w degradację transportera TAP zależną od obecności UL49.5, koncentrując się na wpływie jednego z głównych białek opiekuńczych ER: białka BiP. Jednakże obniżenie poziomu tego białka w komórce nie miało wpływu na funkcjonowanie UL49.5 jako inhibitora TAP.

Drugim aspektem analizy funkcjonowania kompleksu białek UL49.5 i gM BHV-1 była identyfikacja domen i motywów strukturalnych obecnych w badanych białkach odpowiedzialnych za ich wiązanie, dojrzewanie i eksport z ER, jako mechanizm regulujący aktywność UL49.5. W tej części pracy wykazano, że N-końcowa domena UL49.5 była wystarczająca do wiązania gM, jednak region transbłonowy UL49.5 odgrywał rolę regulatorową podczas dojrzewania kompleksu UL49.5/gM. Pokazano również, że najprawdopodobniej pomiędzy regionami transbłonowymi UL49.5 i gM dochodzi do niekwalencyjnych oddziaływań, wystarczająco silnych, by stabilizować kompleks. Do tworzenia kompleksu, jego uwalniania z ER i dojrzewania okazały się niezbędne motywy zamków glicynowych w rejonach transbłonowych gM. Dokładniejsze poznanie reszt aminokwasowych/motywów strukturalnych UL49.5 odpowiedzialnych za hamowanie TAP i/lub wiązanie gM może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmu funkcjonowania badanych białek, wskazując sposoby modyfikacji genetycznych wirusa, który będzie mógł zostać wykorzystany jako bardziej skuteczny wirus szczepionkowy lub wektor onkolityczny w terapii nowotworów człowieka.