

mgr Iga Dalidowska

**Rola białek szoku cieplnego Hsp90 w replikacji ludzkiego  
adenowirusa 5**

***Role of heat shock proteins Hsp90 in human adenovirus 5  
replication***

Rozprawa na stopień naukowy doktora  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. Paweł Bieganowski prof. IMDiK



Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora  
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2022

## STRESZCZENIE

Ludzkie adenowirusy (HAdV) należą do rodziny *Adenoviridae* i są klasyfikowane do rodzaju *Mastadenovirus*. Bezotoczkowe wiriony ikozaedryczne ludzkich adenowirusów mają średnicę od 70 do 90 nm i zawierają ponad 30 białek kodowanych w dwuniciowym DNA o długości 35 kbp. Zakażenie adenowirusem wiąże się głównie z chorobami układu oddechowego. Poza objawami ze strony dróg oddechowych, adenowirusy wywołują także zapalenie rogówki i spojówki, krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego, nieżyt żołądka i jelit, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i zespół hemofagocytarny. U gospodarzy immunokompetentnych infekcje adenowirusowe są zwykle łagodne i samoograniczające się, jednak wśród populacji pacjentów z obniżoną odpornością powodują znaczną zachorowalność i śmiertelność. Podczas replikacji wirusa syntetyzowana jest duża ilość białek, które wymagają pomocy czynników komórkowych w prawidłowym fałdowaniu i ochronie przed agregacją. W zależności od grupy wirusów, podczas replikacji Hsp90 pełni różne funkcje, ułatwiając wnikanie cząstek wirusa do komórki, transport wewnątrzkomórkowy, ekspresję i stabilizację białek oraz replikację genomu.

W niniejszej pracy zidentyfikowano HAdV-5 jako wirusa, którego proces replikacji zależny jest od aktywności opiekuńczej Hsp90. Do zahamowania aktywności Hsp90 wykorzystano specyficzny inhibitor – 17-allylamino-17-demetoksygeldanamycynę (17-AAG). Badania prowadzone były na ludzkich embrionalnych komórkach nerki (HEK293), jak również adenokarcynomicznych ludzkich komórkach nabłonka podstawnego pęcherzyków płucnych (A549).

Wykazano, że 17-AAG wywiera silny, zależny od stężenia, hamujący wpływ na replikację HAdV-5 w stężeniach, które nie wpływają na żywotność komórek A549. Efekt ten był szczególnie wyraźny, gdy inhibitor był dodawany w momencie zakażenia hodowli, co sugerowało, że Hsp90 jest wymagane na wczesnych etapach replikacji HAdV-5. Zjawisko to obserwowane jest w pierwszych 24-godzinach od infekcji, po kolejnej dobie występuje przyspieszenie replikacji wirusa. Świadczy to o tym, że 17-AAG wykazuje działanie spowalniające cykl życiowy HAdV-5, a nie całkowitą jego inhibicję.

Komórki A549 infekowano HAdV-5 i dodawano 17-AAG w konkretnych punktach czasowych, badając tym samym wpływ inhibitora na geny i białka, których ekspresja reprezentuje poszczególne stadia cyklu życiowego HAdV-5. Analiza przebiegu transkrypcji HAdV-5 w czasie, wykazała znaczne hamowanie transkrypcji genów E1A i DBP, w momencie kiedy 0,25 $\mu$ M 17-AAG dodawany był w chwili zakażenia hodowli. Inhibitor jest

mniej skuteczny, gdy zostanie zastosowany w dalszych punktach czasowych. Analogiczny schemat zaobserwowano podczas syntezy białek strukturalnych wirusa, w którym 17-AAG był skuteczny do 9 godziny od zakażenia hodowli. Wraz z wydłużaniem czasu inkubacji, efekt inhibicji był mniej zauważalny. Ostatnie informacje dają podstawy dla hipotezy, że efekt inhibicji skupia się na wczesnych procesach cyklu życiowego HAdV-5, następujących po internalizacji, a poprzedzających replikację DNA.

Po wejściu genomu HAdV-5 do jądra, E1A jest pierwszym genem ulegającym transkrypcji i odpowiada za indukcję transkrypcji z genów wczesnych (E1B, E2A, E2B, E3 i E4) i późnych (L1). Badania wykorzystujące zjawisko transkomplementacji wykazały, że obniżona ilość DNA, pośredniego i późnego mRNA oraz białek struktury HAdV-5, wynika z zahamowania aktywności białka E1A. W zainfekowanych liniach komórkowych HEK293, w których E1A produkowane jest konstytutywnie, dodatek 17-AAG hamował replikację HAdV-5 słabiej, niż w komórkach A549, które nie produkują E1A. Dodatkowo, immunoprecypitacja kompleksów białek oddziałujących z białkiem opiekuńczym wykazała, że Hsp90 wiąże się z białkiem E1A, potwierdzając że E1A może być klientem opiekuńczej aktywności Hsp90. W badaniu z wykorzystaniem cykloheksymidu (CHX) i 17-AAG wykazano, że kombinacja inhibitorów nie zmniejsza stabilności E1A, ani nie zwiększa tempa rozpadu tego białka w komórkach HEK293. Oznacza to, że Hsp90 wymagane jest w procesie dojrzewania nowosyntetyzowanego białka wczesnego HAdV-5, i nie wpływa na ilość obecnego już w komórkach dojrzałego E1A. Wpływ Hsp90 na dojrzewanie nowo syntetyzowanego białka E1A potwierdzają wyniki pokazujące, że inhibicja Hsp90 powoduje zahamowanie syntezy białka E1A w 2 i 4 godzinie od infekcji, pomimo braku zahamowania transkrypcji genu E1A.

Inhibicja replikacji HAdV-5, będąca skutkiem zahamowania aktywności Hsp90, jest zjawiskiem przejściowym. Obserwowany efekt zaniku inhibicji przy długotrwałej infekcji może wynikać z niepełnego zahamowania syntezy E1A, skutkującej stopniowym jego gromadzeniem w komórce. Po 48 godzinach hodowli ilość E1A może być wystarczająca do aktywacji transkrypcji pozostałych genów HAdV-5. Do aktywacji transkrypcji z promotora wczesnego wystarczy jedna z trzech domen białka E1A - konserwatywna domena CR3, dlatego nie można wykluczyć, że nieprawidłowo sfałdowane białko E1A może spełniać rolę aktywatora transkrypcji, jeżeli domena CR3 może przyjąć aktywną konfigurację. Bez względu na to, jaki jest dokładny mechanizm przełamania inhibicji Hsp90, podstawą działania inhibitora Hsp90 jest opóźnienie gromadzenia się w komórkach białka E1A.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań pokazują po raz pierwszy, że Hsp90 bierze udział w syntezie E1A. Ponieważ E1A służy jako koaktywator transkrypcji wczesnych

genów adenowirusa, aktywność przeciwwirusową inhibitora Hsp90 można wyjaśnić obniżonym poziomem białka wczesnego. Otrzymane wyniki mogą w przyszłości posłużyć do projektowania terapii przeciwwirusowych, których stosowanie nie będzie związane z nabywaniem przez wirusy oporności.