

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt. „Internalizacja psiego koronawirusa oddechowego do komórek gospodarza”

Mgr Artur Szczepański

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Pyrc

Błona komórkowa stanowi podstawową barierę dla infekcji wirusowej, a białka obecne na jej powierzchni decydują o specyficzności tkankowej wirusa. By materiał genetyczny wirusa otoczkowego dotarł do wnętrza komórki musi dojść do fuzji jego otoczki z błoną komórkową. W niektórych przypadkach proces ten zachodzi na powierzchni komórki, podczas gdy w innych poprzedzony jest internalizacją do przedziałów wewnątrzkomórkowych z wykorzystaniem naturalnych mechanizmów komórkowych, za pośrednictwem których komunikuje się ona ze środowiskiem i pozyskuje składniki odżywcze.

Głównym celem tej pracy było zidentyfikowanie mechanizmów pozwalających psiemu koronawirusowi oddechowemu (ang. *Canine Respiratory Coronavirus*, CRCoV) na wejście do komórki. Cel ten osiągnięto poprzez identyfikację receptorów wirusa, poznanie jego drogi wejścia do komórki oraz określenia miejsca fuzji z błoną gospodarza. CRCoV to wirus związany z zakaźną chorobą układu oddechowego psów znaną jako kaszel kenelowy – wysoce zaraźliwą chorobą o niskiej śmiertelności, w której przebiegu występują zarówno infekcje wirusowe jak i bakteryjne.

Stwierdzono, że wirus wykorzystuje kwasy sjałowe (ang. *sialic acids*, SAs) do adhezji do powierzchni komórki, jednak cząsteczki te nie są kluczowe dla infekcji, jako że ich zablokowanie nie hamuje zakażenia. Odbudowa otoczki kwasów sjałowych przywróciła zdolność wirusa do wiązania się do powierzchni komórki, potwierdzając rolę SAs jako czynników adhezyjnych, dodatkowo wykazując preferencję CRCoV do α 2,3-SA. Ponieważ niedobór SAs jedynie częściowo hamował adhezję wirusów, przetestowano inne związki identyfikując siarczan heparanu jako alternatywny czynnik adhezyjny. Ponieważ wykazano, że SAs nie służą jako receptory wejścia CRCoV zbadano ludzkie antygeny zgodności tkankowej klasy I (ang. *human leukocyte antigen class I*, HLA1) postulowane w przeszłości jako zaangażowane w wejście ludzkich koronawirusów HCoV-OC43 i HCoV-HKU1.

Zablokowanie interakcji wirusa z HLA1 skutkowało hamowaniem infekcji wykazując jego rolę w procesie wejścia CRCoV. Oprócz CRCoV w badaniu uwzględniono dwa inne blisko spokrewnione koronawirusy: bydłęcego koronawirusa (ang. *Bovine Coronavirus*, BCoV) oraz HCoV-OC43 wywołujące choroby u innych gospodarzy, pomimo wyjątkowo wysokiego podobieństwa ich genomów.

Dalsze etapy wejścia CRCoV zostały zbadane za pomocą mikroskopii konfokalnej, poprzez analizę kolokalizacji wirionów z markerami komórkowymi, oraz ich zachowania w komórkach w których zaburzona została funkcja konkretnych ścieżek (chemiczne inhibitory, wyciszanie wyrażania genów z wykorzystaniem siRNA). Wykazano, że CRCoV dostaje się do komórki z wykorzystaniem endocytozy zależnej od kaweoliny i dynaminy. Ponadto, inaczej niż w przypadku większości koronawirusów wymagających dużo niższego pH i wyższej aktywności katepsyn, jako miejsce fuzji błon zidentyfikowane zostały wczesne endosomy.

Wyniki przedstawione w tej pracy poszerzają naszą wiedzę na temat początkowych etapów zakażenia koronawirusami i mogą w przyszłości wspomóc badania nad nowymi lekami przeciwwirusowymi. Jest to szczególnie istotne w kontekście zdolności koronawirusów do przekraczania bariery międzygatunkowej z zachowaniem wysokiej transmisji w ludzkiej populacji, wywołując zagrażające życiu choroby, co zostało udowodnione przez SARS-CoV, MERS-CoV oraz SARS-CoV-2. Gęstość zaludnienia i mobilność, urbanizacja i wylesianie, degradacja środowiska naturalnego i wiele innych czynników sprawia, że choroby odzwierzęce mają coraz większe znaczenie dla zdrowia publicznego. Trzy blisko spokrewnione wirusy zdolne infekować różnych gospodarzy wydają się być dobrym modelem do badania tego zjawiska.



prof. dr hab. Krzysztof Pyró