



Streszczenie

Obiektem prowadzonych przeze mnie badań w ramach niniejszej dysertacji było białko UL49.5 wirusa BHV-1 oraz wirusa VZV. Oba wirusy należą do tej samej jednostki taksonomicznej tj. rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *Alphaherpesvirinae* i rodzaju *Varicellovirus*. W przypadku obu wirusów, po wnikięciu do organizmu gospodarza dochodzi do biosyntezy wirusowego białka UL49.5. Białko to jest białkiem transbłonowym typu I, co oznacza, że przecina jednokrotnie błonę cytoplazmatyczną. W białkach obu wirusów ze względu na orientację w błonie wyróżnia się trzy istotne biologicznie fragmenty: domenę znajdującą się po stronie siateczki śródplazmatycznej (domena N-końcowa), rejon transbłonowy oraz domenę cytoplazmatyczną (domena C-końcowa) [44]. Białko UL49.5 dokonuje modulacji mechanizmu odpornościowego głównego układu zgodności tkankowej (MHC I) poprzez zahamowanie transportu peptydów patogenu w kompleksie transportera peptydów antygenowych (TAP). W konsekwencji odpowiedź immunologiczna zaatakowanego organizmu zostaje upośledzona. Przypuszcza się, że w przypadku wirusa BHV-1 mechanizm ten polega na wymuszeniu przez białko UL49.5 określonej konformacji transportera TAP [44]. Dotychczasowe badania eksperymentalne opierały się jedynie na analizie aktywności biologicznej zmutowanych wariantów białka, bez korelacji z ich strukturą przestrzenną. Zbadanie struktury białka UL49.5 jest niezbędne do określenia mechanizmu jego aktywności polegającego najprawdopodobniej na „zamrażaniu” transportera TAP w określonej konformacji. Motywy strukturalne poszczególnych fragmentów białka UL49.5 wirusa BHV-1 mogą wpływać na to czy białko będzie inhibitorem, czy będzie wiązać swój cel molekularny oraz czy będzie pozbawione aktywności biologicznej [4]. Białko UL49.5 bydlęcego herpeswirusa typu 1 jest inhibitorem białka TAP, zaś białko UL49.5 wirusa ospy wietrznej i półpaśca nie wykazuje takich właściwości. Białko UL49.5

wirusa ospy wietrznej i półpaśca oddziałuje z białkiem TAP, ale nie hamuje jego aktywności. [1, 2]. Porównanie struktury białka UL49.5 z obu wirusów może wykazać, dlaczego homologiczne białka BHV-1 i VZV różnią się swoją aktywnością. Zbadanie struktury białka UL49.5 jest niezbędne do określenia mechanizmu jego działania. Dotychczas nie udało się pozyskać białka UL49.5 metodami inżynierii genetycznej. Z uwagi na fakt, że UL49.5 jest białkiem błonowym i ulega silnej agregacji oraz jest stabilne tylko w obecności składników kompleksu ładującego peptydy, nie udało się wyizolować białka, aby poddać je badaniom strukturalnym [3].

Celem mojej pracy doktorskiej było określenie właściwości konformacyjnych białka UL49.5 bydlęcego herpeswirusa typu 1 i jego mutantów oraz białka UL49.5 wirusa ospy wietrznej i półpaśca. Celami szczegółowymi pracy były:

1. Zaprojektowanie fragmentów białka UL9.5 wirusa BHV-1 oraz VZV do syntezy,
2. Zaprojektowanie mutantów fragmentu C-końcowego oraz N-końcowego białka UL9.5 wirusa BHV-1 do syntezy,
3. Chemiczna synteza peptydów, będących fragmentami badanych białek oraz ich analogów,
4. Wstępne badań konformacyjne zsyntetyzowanych peptydów z wykorzystaniem techniki CD,
5. Określenie struktury przestrzennej natywnych fragmentów białka UL9.5 wirusa BHV-1 oraz jego mutantów w miceli SDS oraz DPC z wykorzystaniem technik NMR,
6. Określenie struktury przestrzennej fragmentów białka UL9.5 wirusa VZV w miceli DPC z wykorzystaniem technik NMR,
7. Określenie struktury przestrzennej natywnego białka UL9.5 wirusa BHV-1 w błonie POPC,
8. Określenie struktury przestrzennej mutantów (część N-końcowa) białka UL9.5 wirusa BHV-1 w błonie POPC,
9. Poznanie wpływu modyfikacji struktury przestrzennej na aktywność biologiczną białka UL49.5 wirusa BHV-1.

W części doświadczalnej swojej pracy zaprojektowałam oraz otrzymałam peptydy metodą syntezy na nośniku stałym z zastosowaniem metodologii Fmoc. Właściwości fizykochemiczne związków określiłam przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej na fazach odwróconych (RP-HPLC), spektrometrii mas z desorpcją laserową z udziałem matrycy i analizatora czasu przelotu (MALDI-TOF-MS) lub spektrometrii mas z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI-MS). Badania właściwości konformacyjnych fragmentów białka UL49.5 wirusa BHV-1 oraz VZV przeprowadziłam z wykorzystaniem danych eksperymentalnych, które uzyskałam dzięki technice spektroskopii NMR. Obliczenia przeprowadziłam na klastrze obliczeniowym z wykorzystaniem programu AMBER 11. Symulacje dynamiki molekularnej dla każdego z peptydów przeprowadziłam w układzie micela SDS/woda [5] oraz/lub micela DPC/woda [6]. Do symulacji dynamiki molekularnej wykorzystywałam procedurę dodawania więzów uśrednionych po danym oknie czasowym (ang. *time averaged restrains*, TAV) [7]. Trójwymiarowy model białka UL49.5 o pełnej sekwencji otrzymano poprzez wykorzystanie uzyskanych wcześniej struktur fragmentów białka UL49.5 wirusa BHV-1 lub jego mutantów.

Wyniki badań konformacyjnych przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy dowiodły, że białko UL49.5 wirusa BHV-1 posiada strukturę α -helisy we fragmencie *N*-terminalnym (zewnątrzkomórkowym) oraz transbłonowym, zaś fragment *C*-terminalny tworzy strukturę nieuporządkowaną. Wprowadzone mutacje motywu RRE (9-11) w *N*-terminalnym fragmencie białka miały na celu zniesienie struktury α -helisy, a w konsekwencji zmniejszenie aktywności białka w porównaniu do typu dzikiego. W przypadku mutantu RRE(9-11)GGG struktura α -helisy ulega przerwaniu. Mutacja RRE(9-11)AAA oraz RRE(9-11)RRG ustabilizowała strukturę α -helisy. Badania aktywności biologicznej powyższych mutantów zmieniają nieznacznie aktywność biologiczną białka. Postawiona hipoteza o zmniejszeniu aktywności białka w wyniku zmiany struktury przestrzennej motywu RRE(9-11) nie potwierdziła się. Drugim badanym motywem przeze mnie był motyw PPQ(31-33) również w *N*-terminalnym fragmencie białka. Wprowadzone zostały mutacje PPQ(31-33)GGG, PPQ(31-33)AAA, PPQ(31-33)GGQ oraz PPQ(31-33)AAQ. Badania konformacyjne mutantu PPQ(31-33)GGQ wykazały, iż struktura α -helisy we fragmencie *N*-końcowym ulega przerwaniu oraz zwiększa się ruchliwość *N*-terminalnego fragmentu białka. Struktura przestrzenna mutantu PPQ(31-33)AAQ uległa stabilizacji a helisa wydłużyła się. Aktywność białka w przypadku mutantu PPQ(31-33)GGG uległa znacznemu upośledzeniu. W przypadku mutantów PPQ(31-33)AAA oraz PPQ(31-33)AAQ nieznacznie zmniejszyła się aktywność biologiczna białka.

STRESZCZENIE

Wyniki niniejszej pracy prowadzą do pogłębiania wiedzy o strukturze i molekularnych podstawach mechanizmu hamowania odpowiedzi immunologicznej przez herpeswirusy. Ponadto, mogą pomóc w opracowaniu nowych narzędzi do walki z chorobami wirusowymi.