

Doktorant: Aleksandra Milewska

Tytuł rozprawy doktorskiej: Wczesne etapy zakażenia ludzkim koronawirusem NL63.

Promotor: dr hab. Krzysztof Pyrc

Rozprawa przygotowana w oparciu o publikacje:

- 1) Milewska A, Zarebski M, Nowak P, Stozek K, Potempa J, Pyrc K. Human coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells. *J Virol.* 2014 Nov;88(22):13221-30. doi: 10.1128/JVI.02078-14.
- 2) Milewska A, Kaminski K, Ciejka J, Kosowicz K, Zeglen S, Wojarski J, Nowakowska M, Szczubialka K, Pyrc K. HTCC: broad range inhibitor of coronavirus entry. *PLoS One.* 2016 (manuskrypt w końcowej fazie recenzji).

Streszczenie:

Koronawirusy (łac. *Coronaviridae*) posiadają genom w postaci pojedynczej cząsteczki RNA o dodatniej polarności, o długości sięgającej 32 kZ. Dwie trzecie genomu od końca 5' koduje białka konieczne do replikacji RNA oraz modulacji mikrośrodowiska komórkowego, natomiast geny znajdujące się po stronie 3' genomu kodują białka strukturalne, takie jak białko fuzyjne S (ang. *spike*), białko płaszczka (E; ang. *envelope*), białko błonowe (M; ang. *membrane*) oraz białko nukleokapsydu (N; ang. *nucleocapsid*). Białko S pełni istotną rolę, gdyż odpowiada za interakcję wirionu z receptorem na komórkach gospodarza i internalizację wirusa, co zapoczątkowuje proces zakażenia. Koronawirusowe białko S jest zakotwiczone w otocze wirionu poprzez znajdującą się blisko końca C domenę transbłonową. Na powierzchni wirusa białka te występują w postaci trimerów, które tworzą charakterystyczną otoczkę przypominającą koronę słoneczną, od której wirusy te uzyskały swoją nazwę (*corona*). W przypadku niektórych gatunków w genomie kodowane jest dodatkowe białko strukturalne – esteraza hemaglutyniny (HE), odpowiedzialna za odcinanie receptora komórkowego, co ułatwia wejście wirusa do komórki oraz uwalnianie nowych, zakaźnych wirionów.

Koronawirusy zostały podzielone na cztery rodzaje: alfa, beta, delta i gamma. Niemal wszystkie alfa- i beta- koronawirusy zakażają ssaki, natomiast większość przedstawicieli grup delta i gamma wywołuje choroby u ptaków. Do chwili obecnej znanych jest sześć ludzkich koronawirusów (HCoV; ang. *human coronaviruses*). HCoV-229E oraz HCoV-OC43 zostały odkryte w połowie XX wieku i powodują stosunkowo łagodne zakażenia dróg oddechowych. Pojawienie się w latach 2002 - 2003 odzwierzcącego wirusa zespołu ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej (SARS-CoV; ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus*) zwiększyło zainteresowanie tą rodziną patogenów. Epidemia ta została jednak opanowana i wirus ten w swojej wysoce wirulentnej u ludzi formie nie pojawił się od tego czasu. Zintensyfikowanie badań doprowadziło do identyfikacji nieznanymi wcześniej ludzkimi koronawirusów - HCoV-NL63 oraz HCoV-HKU1. Dokładnie 10 lat od pojawienia się wirusa SARS-CoV stwierdzono pojawienie się zupełnie nowej choroby, która przenosi się na ludzi z wielbłądów i powoduje poważną chorobą układu oddechowego oraz nerek, wywoływanej przez MERS-CoV (ang. *middle east respiratory syndrome coronavirus*). Szczęśliwie, wirus ten z bardzo niską wydajnością przenosi się pomiędzy ludźmi (do połowy lipca 2016 roku stwierdzono 634 przypadki śmiertelne spośród 1 782 przypadków zachorowania w 27 krajach).

Ludzki koronawirus HCoV-NL63 został zidentyfikowany w 2004 roku. Przeprowadzone badania wykazały, że jest on nierozpoznanym wcześniej patogenem wywołującym choroby dróg oddechowych oraz głównym czynnikiem etiologicznym pseudokrupu u dzieci. Szacuje się, że wirus ten jest odpowiedzialny za 2-10% wszystkich wirusowych zakażeń układu oddechowego. Choroba ma zazwyczaj przebieg łagodny do umiarkowanego, jednak u osób starszych, dzieci oraz pacjentów z obniżoną odpornością może przybierać postać ciężką, wymagającą hospitalizacji. Receptorem komórkowym HCoV-NL63 jest transbłonowa metaloproteaza ACE2 (ang. *angiotensin-converting enzyme 2*), która jest wyrażana między innymi w komórkach układu oddechowego. Co ciekawe, receptor ten jest również wykorzystywany przez SARS-CoV.

Niniejsza praca miała na celu:

- 1) określenie roli białka ACE2 w procesie wejścia HCoV-NL63 do komórek gospodarza;
- 2) identyfikację innych determinant specyficzności komórkowej i tkankowej dla wirusa;
- 3) wykorzystanie pozyskanych danych do opracowania nowych inhibitorów zakażeń koronawirusowych.

Dla realizacji pierwszego celu pracy przygotowano transgeniczne ludzkie linie komórkowe, wykazujące stabilną nadekspresję białka ACE2. Porównanie procesu zakażenia komórek wyrażających ACE2 na powierzchni (ACE2⁺) z komórkami typu dzikiego (ACE2⁻) wykazało, że białko to jest konieczne i wystarczające dla zakażenia. Aktywna replikacja wirusa w komórkach ACE2⁺ została potwierdzona poprzez analizę obecności subgenomowego RNA wirusa, analizę kinetyki replikacji oraz analizę efektu cytotatycznego.

Nadekspresja białka ACE2 nie wpłynęła jednak na adhezję wirusa do powierzchni komórki, co sugerowało istnienie dodatkowego czynnika odpowiedzialnego za ten proces (Cel 2). Uzyskane wyniki wykazały jednoznacznie, że proteoglikany związane z siarczanem heparanu stanowią czynnik adhezyjny dla HCoV-NL63, a ich obecność jest istotna dla wejścia wirusa do komórki gospodarza, a w efekcie dla przebiegu zakażenia.

Dla realizacji trzeciego celu pracy – identyfikacji nowych inhibitorów wejścia koronawirusów do komórki gospodarza zbadano przeciwkoronawirusową aktywność kationowo zmodyfikowanych polimerów chitozanowych. N-(2-hydroksypropyl)-3-trimetylamonowy chlorek chitozanu (HTCC) oraz jego pochodne zostały uprzednio opisane przez nas, jako inhibitory HCoV-NL63 (Milewska A *et al.* Novel polymeric inhibitors of HCoV-NL63. *Antiviral Research*. 2012). Celem badań przeprowadzonych w niniejszej pracy była identyfikacja mechanizmu działania oraz aktywności polimeru HTCC względem innych ludzkich koronawirusów (229E, OC43 oraz HKU1).

W celu określenia mechanizmu działania przeciwwirusowego HTCC zbadano wpływ polimeru na różnych etapach replikacji HCoV-NL63. Doświadczenia wykazały, że polimer nie inaktywuje bezpośrednio wirionów, ani nie wpływa na adhezję HCoV-NL63 do komórek gospodarza poprzez siarczan heparanu, lecz zapobiega interakcji wirusa z receptorem fuzyjnym – ACE2.

W ramach badań przeprowadzono również analizę kinetyki replikacji czterech ludzkich koronawirusów w obecności polimeru HTCC w modelu *ex vivo* – zróżnicowanych, spolaryzowanych hodowlach, odzwierciedlających oddechowy nabłonek migawkowy *in vivo* (hodowle HAE, ang. *human airway epithelium*). Analiza wykazała aktywność przeciwwirusową HTCC względem HCoV-NL63, HCoV-OC43 oraz HCoV-HKU1, lecz nie HCoV-229E. Z tego względu przygotowano dodatkowe warianty HTCC, różniące się między

sobą stopniem podstawienia chitozanu czwartorzędowymi aminami (DS, ang. *degree of substitution*). Nowe polimery nazwane zostały odpowiednio: HTCC-57, HTCC-62, HTCC-65 i HTCC-77 (DS w zakresie 57-77%). Szczegółowa analiza infekcji koronawirusami NL63, 229E, OC43 i HKU1 na liniach komórkowych oraz hodowlach tkankowych HAE wykazała, że HTCC jest w stanie hamować wejście każdego z ludzkich koronawirusów do komórek gospodarza.

Podsumowując, niniejsza praca wykazała, że polimerowe związki zsyntetyzowane na bazie naturalnego chitozanu stanowią efektywne inhibitory ludzkich koronawirusów i mogą zostać w przyszłości wykorzystane w leczeniu infekcji powodowanych przez te patogeny.

