

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

Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie została umieszczona w publikacji:

Dalidowska I, Gazi O, Sulejczak D, Przybylski M, Bieganowski P, Heat Shock Protein 90 Chaperones E1A Early Protein of Adenovirus 5 and Is Essential for Replication of the Virus. Int J Mol Sci, 2021. 22(4).

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego NCN grant nr 2016/23/B/NZ6/02536

Interdyscyplinarne studia doktoranckie zostały zrealizowane w ramach projektu Och!DOK o numerze POWR. 03.02.00-00-I028/17-00 (Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój współfinansowany ze środków EFS)

Składam podziękowania mojemu Promotorowi dr hab. Pawłowi Bieganowskiemu za poświęcony czas i opiekę merytoryczną.

Dziękuję Pracownikom, Koleżankom i Kolegom z Zakładu Farmakologii Doświadczalnej za okazaną życzliwość.

Szczególne podziękowania kieruję do Rodziny za motywację i wiarę w moje możliwości, dane mi w tym istotnym czasie.

Dziękuję Michałowi za dzielenie radości z osiągnięć i nieustającą wiarę we mnie.

SPIS TREŚCI

| | |
|---|-----------|
| Spis treści | 4 |
| Lista skrótów | 7 |
| Streszczenie..... | 8 |
| Abstract..... | 11 |
| Innowacyjność pracy | 13 |
| 1. Wstęp..... | 14 |
| 1.1. Budowa kapsydu HAdV-5 | 15 |
| 1.2. Organizacja genomu HAdV-5 | 16 |
| 1.3. Cykl replikacyjny HAdV-5 | 16 |
| 1.3.1. Internalizacja i transport wewnątrzkomórkowy | 17 |
| 1.3.2. Geny wczesne | 18 |
| 1.3.3. Struktura i funkcje E1A | 18 |
| 1.3.4. Replikacja DNA | 19 |
| 1.3.5. Geny późne | 20 |
| 1.3.6. Transport z jądra i translacja późnego mRNA | 20 |
| 1.3.7. Składanie wirionów potomnych i ich uwalnianie z komórki gospodarza | 21 |
| 1.4. Hsp90..... | 21 |
| 1.4.1. Cykl ATPazowy | 23 |
| 1.4.2. Inhibitory Hsp90..... | 24 |
| 1.4.3. Hsp90 i wirusy..... | 25 |
| 2. Hipoteza i cel pracy..... | 29 |
| 3. Materiały i metody | 30 |
| 3.1. Hodowle komórkowe i inhibitor..... | 30 |
| 3.1.1. Hodowle komórkowe | 30 |
| 3.1.2. 17-AAG | 30 |
| 3.1.3. Krzywa przeżywalności..... | 30 |
| 3.2. Infekcja wirusem i traktowanie 17-AAG | 30 |
| 3.2.1. HAdV-5 | 30 |
| 3.2.2. Infekcja HAdV-5 | 30 |
| 3.2.3. Propagacja wirusa..... | 31 |
| 3.2.4. Barwienie immunofluorescencyjne AdV5 | 31 |
| 3.2.5. Badanie internalizacji AdV5..... | 31 |
| 3.3. Metody biologii molekularnej | 32 |
| 3.3.1. Izolacja DNA AdV5 | 32 |
| 3.3.2. Izolacja RNA AdV5 | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.3. Ilościowe oznaczanie stężenia kwasów nukleinowych metodą spektrofotometryczną..... | 33 |
| 3.3.4. Izolacja DNA HAdV-5 z medium i komórek | 33 |
| 3.3.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji..... | 35 |
| 3.3.6. Półilościowy PCR | 36 |
| 3.3.7. Ilościowy PCR (qPCR) | 37 |
| 3.4. Przygotowanie plazmidów | 37 |
| 3.4.1. PCR | 37 |
| 3.4.2. Klonowanie | 38 |
| 3.4.3. Ligacja..... | 38 |
| 3.4.4. Transformacja komórek kompetentnych E.coli szczep XL-1 | 38 |
| 3.4.5. Kolonijny PCR..... | 38 |
| 3.4.6. Namnażanie plazmidów | 39 |
| 3.4.7. Mutageneza | 39 |
| 3.4.8. Sekwencjonowanie..... | 39 |
| 3.5. Ekspresja białek | 39 |
| 3.5.1. Transfekcja..... | 39 |
| 3.5.2. Izolacja białka | 40 |
| 3.5.3. Badanie ekspresji receptorów CAR i receptorów integrynowych αV | 40 |
| 3.5.4. Barwienie immunofluorescencyjne ADP | 40 |
| 3.5.5. Barwienie immunofluorescencyjne E1A..... | 41 |
| 3.5.6. Hamowanie ekspresji białek cykloheksymidem (CHX) | 41 |
| 3.5.7. Koimmunoprecypitacja (co-IP)..... | 41 |
| 3.5.8. SDS-PAGE i immunodetekcja..... | 41 |
| 3.5.9. Analiza densytometryczna | 42 |
| 3.6. Analiza statystyczna..... | 42 |
| 4. Wyniki | 43 |
| 4.1. Wpływ 17-AAG na przejściową inhibicję replikacji HAdV-5 | 43 |
| 4.2. Wpływ stężenia 17-AAG i początkowego inokulum HAdV-5 na inhibicję replikacji | 44 |
| 4.3. Wpływ 17-AAG na proces wiązania HAdV-5 do komórek gospodarza | 45 |
| 4.3.1. Synteza receptorów CAR i receptorów integrynowych αV | 45 |
| 4.3.2. Translokacja receptorów CAR..... | 46 |
| 4.3.3. Adsorpcja HAdV-5 do powierzchni komórki gospodarza | 46 |
| 4.4. Wpływ 17-AAG na produkcję wirionów potomnych HAdV-5 | 47 |
| 4.5. Wpływ 17-AAG na replikację HAdV-5 w komórkach oraz na sekrecję wirionów potomnych do medium..... | 48 |
| 4.6. Wpływ 17-AAG na przejściową ekspresję sklonowanych białek HAdV-5..... | 49 |
| 4.7. Wpływ 17-AAG na ekspresję białek struktury HAdV-5 | 50 |
| 4.8. Wpływ 17-AAG na transkrypcję genów HAdV-5 | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 4.9. Rekompensacja inhibicji replikacji HAdV-5 przez endogenne E1A | 52 |
| 4.10. Wpływ 17-AAG na sublokalizację komórkową E1A w liniach komórkowych A549 i HEK29353 | |
| 4.11. Wpływ 17-AAG na ekspresję białka wczesnego E1A i jego mRNA..... | 54 |
| 4.12. Wpływa 17-AAG na syntezę <i>de novo</i> E1A | 55 |
| 4.13. Koimmunoprecypitacja Hsp90 α E46A z E1A 289R..... | 56 |
| 5. Dyskusja..... | 57 |
| 5.1. Ocena wpływu 17-AAG na proces replikacji HAdV-5 | 57 |
| 5.2. Ocena aktywności Hsp90 w procesie dojrzewania receptorów i adsorpcji HAdV-5 do komórki gospodarza..... | 58 |
| 5.3. Ocena aktywności Hsp90 na poszczególnych etapach replikacji HAdV-5..... | 59 |
| 5.4. Ocena udziału Hsp90 podczas wczesnych etapów replikacji HAdV-5 i interakcji z białkiem E1A..... | 61 |
| 5.5. Ocena przejściowej inhibicji replikacji HAdV-5 w obecności 17-AAG..... | 63 |
| 5.6. Ocena udziału Hsp90 podczas późnych etapów replikacji i tworzenia się infekcyjnych cząstek HAdV-5 | 63 |
| 5.7. Podsumowanie..... | 66 |
| 6. Wnioski | 67 |
| 7. Literatura..... | 68 |

LISTA SKRÓTÓW

| Skrót | Nazwa angielska | Nazwa polska |
|-------------------|--|--|
| 17-AAG | <i>17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin</i> | 17-allylamino-17-demetoksygeldanamycyna |
| ADP | <i>Adenovirus Death Protein</i> | Adenowirusowe białko śmierci |
| ATP | <i>Adenosine triphosphate</i> | Adenozyno-5'-trifosforan |
| A549 | <i>Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells</i> | Adenokarcynomiczne ludzkie komórki nabłonka podstawnego pęcherzyków płucnych |
| CAR | <i>Coxsackievirus and adenovirus receptor</i> | Receptor dla coxsackie i adenowirusów |
| CHX | <i>Cycloheximide</i> | Cykloheksymid |
| CR1-CR4 | <i>Conserved regions (1-4)</i> | Konserwatywne regiony 1-4 |
| CRM1 | <i>Exportin – 1</i> | Eksportyna 1 |
| DBP | <i>DNA bindingprotein</i> | Białko wiążące DNA |
| E1A | <i>Adenovirus early protein</i> | Białko wczesne adenowirusa |
| E1 –E4 | <i>Adenovirus early region 1-4</i> | Adenowirusowy region wczesny 1-4 |
| GA | <i>Geldanamycin</i> | Geldanamycyna |
| HAdV-5 | <i>Human Adenovirus – 5</i> | Ludzki adenowirus 5 |
| HEK293 | <i>Human embryonic kidney cells</i> | Ludzkie embrionalne komórki nerki |
| ITR | <i>Inverted-terminal repeats</i> | Odwrócone powtórzenia końcowe |
| L1-4 | <i>Adenovirus late region 1-4</i> | Adenowirusowy region późny 1-4 |
| MLP | <i>Major Late Promoter</i> | Główny późny promotor |
| MLTU | <i>Major Late Transcription Unit</i> | Główna późna jednostka transkrypcyjna |
| PD | <i>Packaging Domain</i> | Domena pakująca |
| pTP | <i>Precursor terminal protein</i> | Prekursorowe białko końcowe |
| VA1/22 RNA | <i>Viral-associated RNA 1 / 2</i> | RNA związane z wirusem 1/2 |
| TCID50 | <i>Tissue culture infectious dose</i> | Dawka zakaźna kultury tkankowej |

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 0,25µM 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.

ABSTRACT

Human adenoviruses (HAdV) belong to the *Adenoviridae* family and are classified to the genus *Mastadenovirus*. The non-enveloped icosahedral virions of human adenoviruses are 70 to 90 nm in diameter and contain more than 30 proteins encoded in 35 kbp double-stranded DNA. Adenovirus infection is mainly associated with respiratory diseases. In addition to respiratory symptoms, adenoviruses also cause keratoconjunctivitis, hemorrhagic cystitis, gastroenteritis, meningitis, and haemophagocytic syndrome. In immunocompetent hosts, adenoviral infections are usually mild and self-limiting, but in the immunocompromised patient population adenovirus may cause significant morbidity and mortality.

During viral replication, a large number of proteins are synthesized. In this process viral proteins require the assistance of cellular factors in proper folding and protection against aggregation. Depending on the group of viruses, during replication Hsp90 performs various functions facilitating the entry of viral particles into the cell, intracellular transport, protein expression and stabilization, and genome replication.

In this study, HAdV-5 was identified as a virus which replication process is dependent on the chaperone activity of Hsp90. A specific inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) was used to inhibit the activity of Hsp90. The studies were conducted on human embryonic kidney cell line (HEK293) as well as adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549).

17-AAG has been shown to have a strong dose-dependent inhibitory effect on HAdV-5 replication at concentrations that do not affect A549 cell viability. This effect was particularly visible when inhibitor was added at the time of infection, suggesting that Hsp90 is required in the early stages of HAdV-5 replication. This phenomenon is observed in the first 24-hours after infection, after the next 24 hours the virus replication accelerates. This shows that 17-AAG slows down the life cycle of HAdV-5 and not completely inhibits it.

A549 cells were infected with HAdV-5 and 17-AAG was added at specific time points, thereby examining the effect of the inhibitor on genes and proteins whose expression represents each stage in the HAdV-5 life cycle. Analysis of the course of HAdV-5 transcription over time showed significant inhibition of E1A and DBP gene transcription when 0.25 μ M 17-AAG was added at the time of infection. The inhibitor is less effective when applied at later time points. An analogous pattern was observed during the synthesis of viral structural proteins in which 17-AAG was effective up to 9 hours after infection. As the incubation time increased, the inhibitory effect was less noticeable. Latter observations support the hypothesis that the inhibitory effect focuses on the early life cycle processes of

HAdV-5 following internalization and preceding DNA replication.

After HAdV-5 genome enters the nucleus, E1A is the first gene to be transcribed and is responsible for the induction of transcription from the early (E1B, E2A, E2B, E3 and E4) and late (L1) genes. Studies using the phenomenon of transcomplementation have shown that the reduced amount of DNA, intermediate and late mRNA and structure proteins of the HAdV-5 results from the interference of E1A protein activity. In infected HEK293 where E1A is constitutively expressed, the addition of 17-AAG inhibited HAdV-5 replication to a lesser extent than in A549 that do not produce E1A. In addition, immunoprecipitation of protein complexes showed that Hsp90 binds to the E1A protein, confirming that E1A may be a client of the chaperone activity of Hsp90.

In a study with cycloheximide (CHX) and 17-AAG, it was shown that the combination of inhibitors did not reduce the stability of E1A, nor did it increase the rate of degradation of this protein in HEK293 cells. This indicates that Hsp90 is required for the maturation of the newly synthesized HAdV-5 early protein, and does not affect mature E1A already present in cells. The effect of Hsp90 on the maturation of the newly synthesized E1A is confirmed by the observation that inhibition of Hsp90 causes a disruption of E1A protein synthesis at 2 and 4 hours after infection, despite the lack of inhibition of E1A gene transcription.

Interference of HAdV-5 replication, due to inhibition of Hsp90 activity, is a temporary phenomenon. The disappearance of inhibition effect in long-term infection may result from incomplete disruption of E1A synthesis, resulting in its gradual accumulation in the cell. After 48 hours of culture, the amount of E1A may be sufficient to activate the transcription of the remaining HAdV-5 genes. Only one of the three conserved regions - conserved CR3 domain, is necessary to activate transcription from early promoter. Therefore it cannot be ruled out that the misfolded E1A protein may act as a transcription activator if the CR3 domain has the active configuration. Whatever the exact mechanism for breaking Hsp90 inhibition is, the basis of the action of the Hsp90 inhibitor is the delay in the accumulation of E1A protein in the cells.

The results presented in this work show for the first time that Hsp90 is involved in the synthesis of E1A. As E1A serves as a co-activator of transcription of the adenovirus early genes, the antiviral activity of the Hsp90 inhibitor can be explained by the decreased level of the early protein. The obtained results can be used in the future to design antiviral therapies, which usage will not be associated with the virus resistance.

INNOWACYJNOŚĆ PRACY

Oporność na leki przeciwwirusowe pojawia się w wyniku powstawania adaptacyjnych mutacji przy przedłużonej ekspozycji na stosowany lek przy ciągłej replikacji wirusa. Skutkuje to selekcją opornych szczepów. Jest to trudny do rozwiązania problem powodujący zmniejszającą się efektywność kuracji. Rozwiązaniem jest projektowanie związków skierowanych na czynniki komórkowe gospodarza, które uczestniczą w procesie infekcji poszczególnych wirusów. Innowacyjny element pracy doktorskiej stanowi identyfikacja Hsp90 jako czynnika komórkowego wymaganego do replikacji ludzkiego adenowirusa 5.

W niniejszej pracy opisano wykraczające poza aktualną wiedzę literaturową ustalenia:

- 17-(allylamino)-17-demetoksygeldanamycyna (17-AAG) będąca inhibitorem białka opiekuńczego Hsp90, zmniejsza o 95% szybkość replikacji ludzkiego adenowirusa 5 (HAdV-5) w hodowlach komórkowych.
- 17-AAG hamuje transkrypcję wczesnych i późnych genów HAdV-5, replikację wirusowego DNA i ekspresję białek wirusowych.
- Zahamowanie Hsp90 powoduje zmniejszenie ilości nowo zsyntetyzowanego białka E1A.
- Spadek ilości białka E1A nie jest wywołany zmniejszeniem poziomu kodującego go mRNA.
- Inhibicja Hsp90 nie powoduje degradacji dojrzałego białka E1A obecnego w komórce przed ekspozycją na inhibitor.
- Koimmunoprecypitacja wykazała, że białko wczesne oddziałuje z Hsp90 tworząc kompleksy Hsp90 α E46A - E1A 289R.
- Sumarycznie przedstawione wyniki pokazują po raz pierwszy, że Hsp90 chroni przed degradacją nowo syntetyzowane białko E1A.

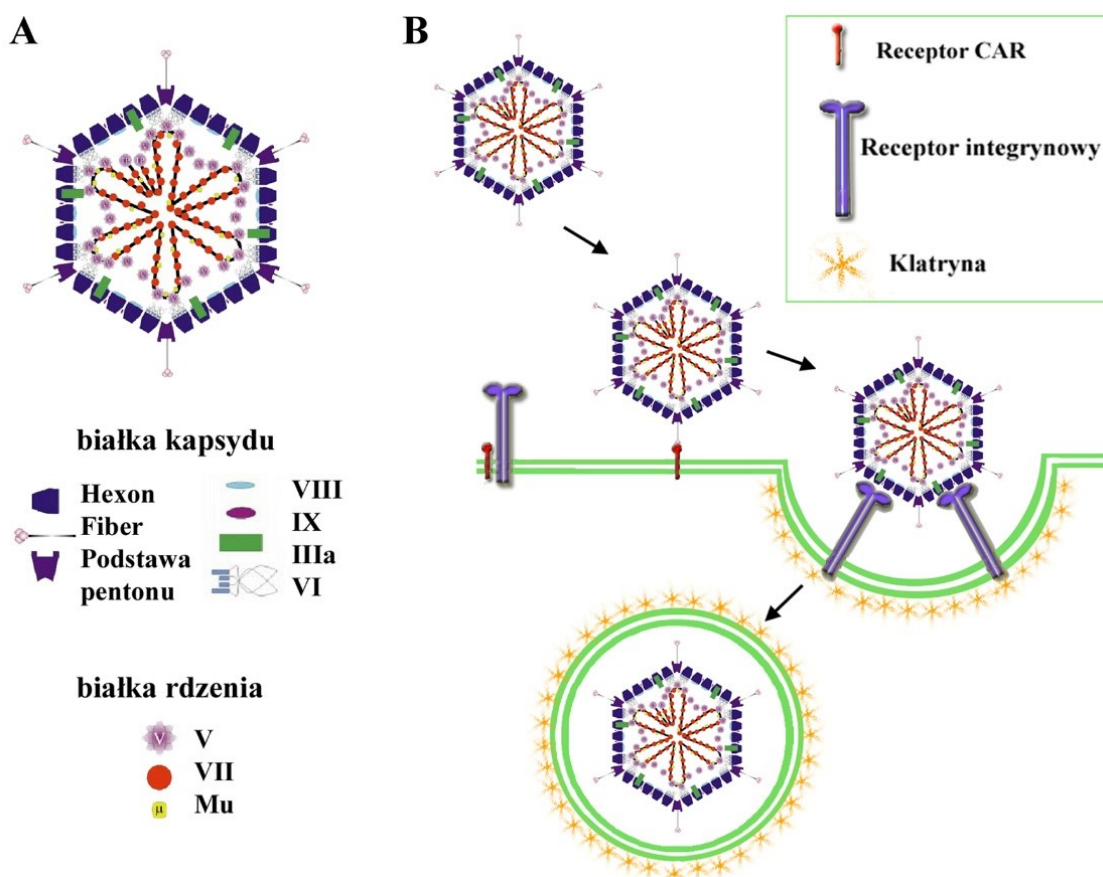
Otrzymane wyniki mogą posłużyć do projektowania leków przeciwwirusowych, których stosowanie nie będzie związane z powstawaniem oporności, jak również takich, które będą charakteryzować się szerszym spektrum działania, wykraczającym poza jedną grupę wirusów.

1. WSTĘP

Adenowirusy zostały po raz pierwszy wyizolowane w 1950 roku z migdałków gardłowych, skąd wywodzi się ich nazwa (*ang. adenoid*). Zostały wskazane jako czynniki chorobotwórcze wywołujące ostre choroby układu oddechowego [1-2]. Poza wspomnianymi objawami ze strony górnych oraz dolnych dróg oddechowych, adenowirusy wywołują także zapalenie rogówki i spojówki, krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego, nieżyt żołądka i jelit, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i zespół hemofagocytarny [3-4]. Infekcje pojawiają się sporadycznie i bez sezonowości [5]. Ponadto, jak wykazały badania epidemiologiczne, pierwotne zakażenia adenowirusem pojawiają się w pierwszych latach życia, jednak w większości przypadków nie wymagają one leczenia farmakologicznego, bądź wymagają umiarkowanego leczenia jeśli infekcja przyjmie postać zapalenia gardła lub tchawicy [6]. Infekcje adenowirusami są zjawiskiem endemicznym. Epidemie pojawiają się w mocno zaludnionych i zamkniętych środowiskach takich jak placówki służby zdrowia, szkoły i wojskowe obozy szkoleniowe. W ciągu ostatnich kilku lat, w krajach z wysoką gęstością zaludnienia, pojawiały się epidemie objawiające się jako zespół ostrej niewydolności oddechowej (*ang. acute respiratory distress syndrome, ARDS*) [7-9]. U pacjentów z obniżoną odpornością, infekcje adenowirusami są zwykle cięższe i mogą prowadzić do śmierci. Do grupy zwiększonego ryzyka należą osoby z pierwotnym i wtórnym niedoborem odporności. Do drugiej grupy o zwiększonym ryzyku zalicza się (i) osoby, których obniżenie odporności wynika z celowej immunosupresji po zabiegu transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych, szpiku kostnego i organów; (ii) pacjentów poddawanych chemioterapii; (iii) pacjentów z AIDS; (iv) osób niedożywionych [10-11].

Na chwilę obecną wyróżniono 70 typów ludzkich adenowirusów (HAdV), podzielonych na 7 serotypów (A-G). Pierwsze 51 typów zostało zaklasyfikowane do poszczególnych serotypów w oparciu o neutralizację krzyżową, podobieństwa sekwencji i właściwości aglutynacji [6, 12]. W przypadku nowych typów odchodzi się od nomenklatury „serotypu” na rzecz „genotypu”, ponieważ zastosowano podział HAdV-5 w oparciu o nowe sekwencje bądź filogenetyczne różnice w genach kodujących główne białka kapsydu [13-14].

1.1. Budowa kapsydu HAdV-5



Ryc.1. (A) Budowa kapsydu HAdV-5 (B) proces internalizacji HAdV-5 z użyciem receptorów I- i II-rzędowych.

Dokładna budowa wirionu HAdV-5 została opublikowana w 2010 roku. Metody krystalograficzne i mikroskopii krioelektronowej umożliwiły szczegółowe opisanie elementów strukturalnych kapsydu o średnicy 90-100 nm [15-16]. Ikozaedralny kapsyd HAdV-5 zawiera wiele kopii głównych białek, do których zaliczyć możemy hexon, penton, fiber, jak również IIIa, VI, VIII i IX- stanowiące mniejsze białka kapsydu. Hexon stanowi najliczniejsze białko, które w każdym kapsydzie tworzy 240 homotrimerów i buduje 20 ścian bocznych [17-18].

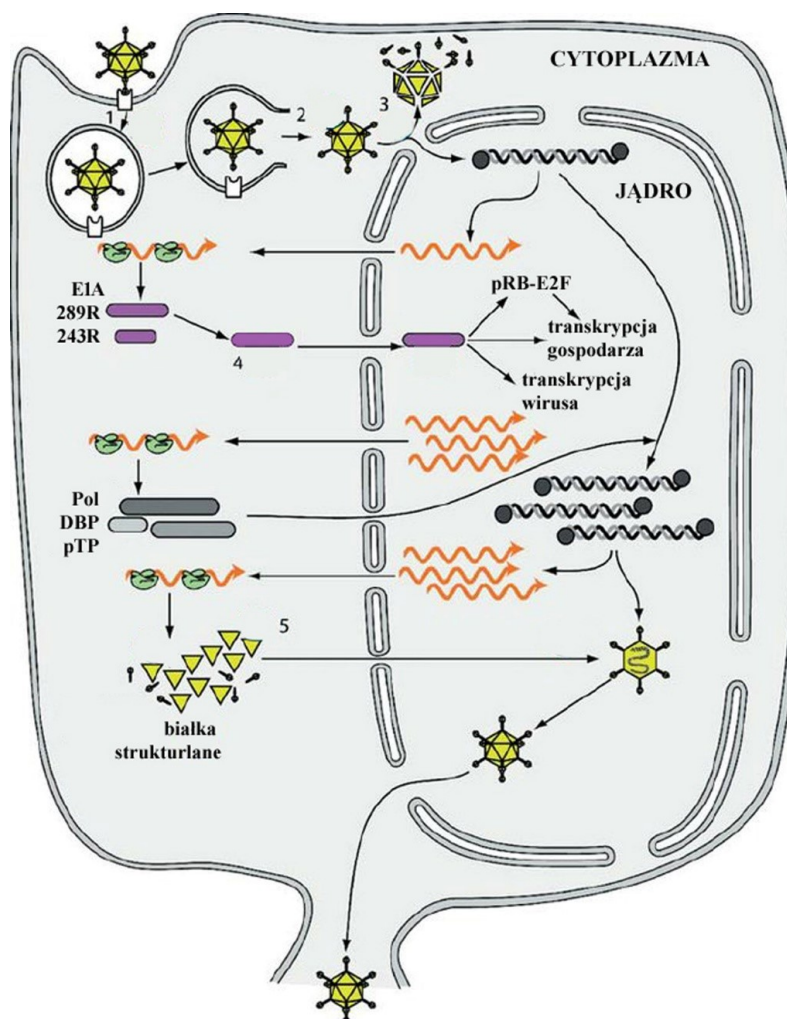
Drugi rodzaj kapsomerów stanowi penton będący kompleksem między trimerycznym białkiem fiber i pentomerycznym białkiem podstawy pentonu. Białko fiber jest niekowalencyjnie związane z podstawą pentonu. Ten typ wiązania ma znaczenie podczas początkowych etapów infekcji polegających na internalizacji wirusa [19-20]. Cztery mniej liczne białka strukturalne – IIIa, VI, VIII i IX konieczne są do poprawnego składania kapsydu, stabilizowania wiązań między kapsomerami hexonu i obniżaniu wrażliwości na temperaturę [21-22].

1.2. Organizacja genomu HAdV-5

Genom adenowirusów stanowi liniowy dsDNA zbudowany z ~35 kpz. Na 5' końcu nici DNA znajdują się odwrócone powtórzenia o długości 100-180 pz – ITR (*ang. inverted terminal repeats*), które umożliwiają dwukierunkową transkrypcję genów AdV. ITRs są niekodującymi sekwencjami i do każdego 5' końca związane są kowalencyjnie białka TP (*ang. terminal protein*) o masie 55 kDA [6,23]. Początkowe 50 pz w obrębie każdego ITR stanowi region inicjacji replikacji, a końcowe 18 pz obejmuje region pomocniczy wiążący komórkowe czynniki transkrypcyjne. Związane białka TP, powstałe w wyniku procesu dojrzewania z prekursorów (pTP), funkcjonują jako primery do syntezy nici potomnych, wykorzystywanych przez wirusową polimerazę [24]. Ponadto, genom adenowirusa zawiera sekwencję ψ , która jest zwykle zawarta w pierwszych 390-400 pz lewego końca genomu. Do regionu ψ wiążą się białka biorące udział w pakowaniu genomu do kapsydu wirusa potomnego [25-26]. Genom adenowirusa koduje 40 genów i zorganizowany jest w 10 odrębnych jednostek transkrybowanych przez komórkową RNA Pol II. Wyróżniamy jednostki wczesne (E1a, E1b, E2, E3, E4), pośrednie (IVa2, pIX, L4) i późne (L1-L5) [27]. Związane z wirusem RNA (*VA, ang. viral-associated*) są transkrybowane przez RNA Pol III. VA RNA I i VA RNA II są to niekodujące sekwencje o długości ~ 160 nt konieczne do wydajnej translacji w późnych etapach zakażenia, jak również inhibicji odpowiedzi zainfekowanej komórki na interferon [28].

1.3. Cykl replikacyjny HAdV-5

Cykl replikacyjny HAdV-5 został podzielony na dwie fazy: wczesną i późną, oddzielone przez rozpoczęcie procesu replikacji genomu wirusa. Pierwsza obejmuje wniknięcie wirusa do komórki gospodarza, eksport DNA do jądra, następnie transkrypcję i translację genów wczesnych. Początkowe etapy modulują środowisko komórkowe ułatwiając proces replikacji HAdV-5 i umożliwiając przeprowadzanie fazy późnej składającej się z etapów transkrypcji i translacji genów późnych. Tym samym zachodzi składanie i dojrzewanie wirionów potomnych [29].



Ryc.2. Cykl replikacyjny HAdV-5 (rycina według [29]).

1.3.1. Internalizacja i transport wewnątrzkomórkowy

Pierwszym etapem internalizacji jest adhezja HAdV-5 do powierzchni komórki. W procesie tym uczestniczy domena C-końcowa białka fiber, która tworzy kolistą strukturę „główkę” (*ang. fiber knob*) i uczestniczy w wiązaniu do pierwszorzędowych receptorów komórkowych. Występuje również domena N-końcowa, „trzon” (*ang. shaft*), zakotwiczony w wirusowym kapsydie, który odgrywa znaczącą rolę w adhezji zapewniając elastyczność białku fiber [15,30]. Większość ludzkich adenowirusów wykorzystuje receptory CAR (*ang. Coxsackie and adenovirus receptor*), jednak w zależności od przynależności do serotypu A-F, HAdV mogą wykorzystywać inne receptory, takie jak desmogleina 2, CD46 i kwas sialowy [31-33]. Sygnały determinujące endocytozę pochodzą z receptorów drugorzędowych-integrzyn. Związanie przez HAdV-5 receptorów integrzynowych powoduje tworzenie dołków opłaszczonych klatryną oraz endocytozę wirusa do światła nowopowstałych pęcherzyków [34]. Podczas transportu wewnątrzkomórkowego, proces uwalniania nukleokapsydu z pęcherzyków do cytoplazmy bazuje na stopniowych zmianach strukturalnych i destabilizacji

białek wirusa. W związku z powstającym napięciem mechanicznym, jak również panującym w endosomach niskim pH następuje zaburzenie integralności nukleokapsydu [35]. W cytoplazmie, HAdV-5 do transportu wewnątrzkomórkowego wykorzystuje zmiany konformacyjne dyneiny, Wniknięcie wirusa do jądra zależne jest od kinezyń oraz eksportyn CRM1, dzięki którym następuje związanie cząsteczek wirusa do kompleksów porów jądrowych [36-37].

1.3.2. Geny wczesne

Po wejściu genomu HAdV-5 do jądra, E1A jest pierwszym genem ulegającym transkrypcji i odpowiada za indukcję transkrypcji pozostałych genów HAdV-5 jak również modulację ekspresji genów komórkowych [38]. Kinetyka transkrypcji jest odmienna dla każdego z genów wczesnych. Pierwszą jednostką jest E1A, której produkt białkowy pojawia się wcześnie w przebiegu infekcji i jego poziom utrzymuje się do fazy późnej. Równie wcześnie co E1A aktywacji ulega jednostka E4. Obserwowana wczesna obecność E4 ma odzwierciedlenie w funkcji którą pełni, ponieważ jest konieczna, w połączeniu z E1A, do trans-aktywacji transkrypcji z regionu E2. Następnie transkrypcji ulegają jednostki E3, E1B i E2 [39-40]. Jednostka E3 generuje powstawanie mRNA, które ulega translacji do białek 12.5K, 6.7K, gp19K, 10.4K, 14.5K i 14.7K. Produkty genów E3 są odpowiedzialne za kontrolę odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Transkrypcja z jednostki E3 utrzymuje się do późnych etapów infekcji, ponieważ oprócz inhibicji odpowiedzi immunologicznej gospodarza uczestniczy w etapach poprzedzających uwolnienie wirionów potomnych [39, 41-42]. Transkrypcja E1B rozpoczyna się później, jednak podobnie jak E1A utrzymuje się do późnych etapów infekcji [39]. Produkty białkowe tej jednostki – E1B 55K, E1B 19K hamują syntezę białek komórkowych gospodarza w wyniku preferencyjnego transportu mRNA HAdV-5 [43-44]. Z regionu E2 w wyniku alternatywnego splicingu powstają dwie klasy transkryptów – E2A i E2B. Produkty białkowe powstałe z tej jednostki to 140K polimeraza (HAdV Pol) i 87K pTP i DBP, niezbędne w procesie replikacji DNA [43,45].

1.3.3. Struktura i funkcje E1A

Gen E1A znajduje się w obrębie pierwszych 1500 pz genomu HAdV-5 i koduje białko, które wpływa na środowisko komórki, stwarzając optymalne warunki do namnażania wirusa. Pierwotny transkrypt wczesnego regionu E1, w wyniku alternatywnego splicingu generuje pięć różnych mRNA. Dwie najliczniej występujące formy E1A to 243R i 289R powstające odpowiednio z 12S i 13S mRNA. Pozostałe transkrypty – 9S, 10S i 11S są obecne jedynie w późnych fazach infekcji i występują w niewielkich ilościach [46-48]. 289R i 243R

oddziałują z wieloma białkami poprzez domeny funkcyjne. Dłuższa forma posiada unikalny dla siebie region CR3, związany z aktywacją transkrypcji, zaś krótsza posiada 80 aminokwasową sekwencję na N-końcu związaną ze zdolnością do transkrypcyjnej represji genów komórkowych zaangażowanych w proliferację i różnicowanie komórek [49]. Region ten oddziałuje z wieloma regulatorami transkrypcji tj. p300, CBP (CREB binding protein), pCAF acetylotransferazy, TBP, p400, hGCN5, TRRAP, Tip60 [47-48].

Zdolność regulowania procesu transkrypcji w komórkach gospodarza jak również wirusa oparta jest na interakcji E1A z wieloma białkami, które funkcjonują jako czynniki transkrypcyjne (ATF-2, YY1), koaktywatory (CBP/p300), korepresory (CtBP), czynniki przebudowy nukleosomów (SWI/SNF) [50]. Porównanie sekwencji E1A w obrębie różnych serotypów AdV pozwoliło wyróżnić 4 konserwatywne regiony (CR1-CR4) zawierające sekwencje przez które E1A oddziałuje z ponad 50 białkami i wiąże się z ponad 17,000 promotorami [51-52]. W większości transaktywacji bierze udział region CR-3, jednak najlepiej poznany mechanizm regulacji transkrypcji jest zależny od CR1 i CR2 zlokalizowanych na N-końcu E1A. E2F jest czynnikiem transkrypcyjnym, który reguluje cykl komórkowy. Jego związanie z DP-1 i pRB hamuje aktywację transkrypcji. Białko E1A rozbija kompleks E2F/pRb wiążąc się z pRB i aktywuje E2F przez jego fosforylację za pośrednictwem kinazy cyklinozależnej. Wolny i ufosforylowany E2F kierowany jest na wirusowy promotor E2 [53-56].

W przypadku represji transkrypcji zaproponowano dwuetapowy model. W pierwszej kolejności E1A poprzez N-koniec i region CR1 wiąże się do domeny TRAM powodując inhibicję aktywności acetylotransferazy histonowej (HAT) w obrębie p300/CBP. Drugi etap polega na zahamowaniu transkrypcji poprzez zakłócenie tworzenia kompleksu TBP-TATA, przez związanie TBP do aminokwasów w obrębie N-końca białka E1A [49, 57-58].

1.3.4. Replikacja DNA

W miarę akumulacji w jądrze produktów białkowych z jednostki E2 rozpoczyna się proces replikacji. Jej inicjacja zachodzi przez kowalencyjne dołączenie dCMP przez polimerazę HAdV-5 do białka pTP. Jest to pierwszy etap formacji kompleksu złożonego z trinukleotydowej sekwencji z białkiem starterowym (pTP-CAT) [24, 59]. Wspomniany związek pośredni wiąże się do sekwencji 3'-TAG matrycy, a następnie przez mechanizm „*jumping back*” cofa się do komplementarnych nukleotydów 3'-GTA w pozycji 1-3 [60]. Krótco po tym, HAdV-5 Pol oddysocjowuje od pTP i wydłuża nowopowstającą nić. Produktem pierwszej rundy replikacji jest dsDNA i ssDNA. Nić, która nie uległa replikacji jest usuwana z dupleksu i tworzy kolistą strukturę drugorzędową tzw. paletkową (*ang. pan-*

handle), która w miejscach ITR wiąże HAdV-5 Pol. Proces elongacji jest wspomagany przez aktywność białka DBP, opierającą się na jego oligomeryzacji wzdłuż ssDNA w miarę postępu widełek replikacyjnych. Zakończeniem replikacji jest powstanie dwóch nici dsDNA, które mogą stanowić matrycę do dalszej amplifikacji DNA, bądź służyć do transkrypcji genów z jednostki późnej [61-62].

1.3.5. Geny późne

Wszystkie późne geny (L1-L5) produkowane są z pojedynczej jednostki transkrypcyjnej, nazywanej główną jednostką późnej transkrypcji (*ang. major late transcription unit, MLTU*), z której w wyniku alternatywnego splicingu i wykorzystania różnych miejsc poliadenylacji powstaje 20 późnych mRNA [43]. Transkrypcja genów MLTU kontrolowana jest przez jeden promotor MLP (*ang. major late promoter*) [63]. Wyjątek stanowi gen L4-22K, który transkrybowany jest z wewnętrznego promotora L4 (L4P) zlokalizowanego w ramce odczytu L4-100K [64]. Pierwsze transkrybowane w przebiegu infekcji białko wczesne - E1A transaktywuje MLP i indukuje ekspresję z jednostki L1 [65]. mRNA genów późnych eksportowane są do cytoplazmy, gdzie następuje ich translacja i produkcja białek struktury.

1.3.6. Transport z jądra i translacja późnego mRNA

Podczas późnej fazy infekcji HAdV-5, syntetyzowana jest duża ilość białek biorących udział w produkcji wirionów potomnych, ich składaniu, pakowaniu DNA i dojrzewaniu. Na tym etapie obserwowana jest dominująca synteza białek wirusowych przy jednoczesnym zahamowaniu produkcji białek komórkowych. Zjawisko to nie jest jednoznaczne ze spadkiem ilości i stabilności mRNA gospodarza, jednak wskazuje na selektywny transport późnego mRNA wirusa do cytoplazmy i jego preferencyjną translację [66]. Wykazano, że 3 elementy – RNA VA1, TPL, L4-100K konieczne są do zwiększenia wydajności translacji mRNA HAdV-5.

Białko 100K jako pierwsze ulega ekspresji podczas fazy późnej i jest w stanie blokować translację mRNA gospodarza poprzez uniemożliwienie rozpoznania struktury 5' kapu. Ten alternatywny mechanizm to „*ribosome shunting*” i możliwy jest dzięki 5' niekodującym regionom liderowym (*ang. 5'NCR tripartite leader*), które przez obecność unikalnych sekwencji powodują zmianę lokalizacji podjednostek 40S rybosomu z końca 5' do kodonu inicjacyjnego [67-68]. VA RNA I jest istotny w selektywnej translacji genów HAdV-5. VA RNA I blokuje fosforylację EIF2 α umożliwiając translację białek AdV [69-70].

Sumarycznie, opisane mechanizmy przejścia maszynerii translacji przez AdV skutkują wzmożoną syntezą białek wirusa koniecznych do składania wirionów potomnych.

1.3.7. Składanie wirionów potomnych i ich uwalnianie z komórki gospodarza

Do rozpoczęcia procesu składania wirionów potomnych konieczny jest transport białek strukturalnych wirusa do jądra. W procesie tym uczestniczą nukleocytoplazmatyczne białka wahadłowe z rodziny karioferyn/importyn [71]. Przedstawiono dwa modele potencjalnego składania wirionów potomnych. Pierwszy zakłada sekwencyjny montaż zależny od hydrolizy ATP [72]. Drugi model to tzw. mechanizm zgrany. W tym modelu, białka kapsydu tworzą struktury przypominające chromatynę, złożone z genomu HAdV-5 i kondensujących białek strukturalnych [73]. Dojrzewanie wirionów potomnych HAdV-5 zachodzi w jądrze i wymaga przeprowadzenia procesów proteolizy białek prekursorowych kapsydu (pIIIa, pVI, pVIII), rdzenia (pVII, p μ , pTP) przez proteazę AdV (L3-23K) [74-75]. Pakowanie DNA HAdV-5 rozpoczyna się z lewej strony genomu między ITR a miejscem rozpoczęcia transkrypcji E1A, gdzie zlokalizowana jest unikatowa sekwencja Ψ , zwana domeną pakującą PD (*ang. packaging domain*). W procesie tym uczestniczą białka wirusa (L1-52/55L, IIIa, IVa2, L4-33K, L4-22K), jak również białka komórkowe [76-77]. Wraz z akumulacją dojrzałych wirionów potomnych dochodzi do lizy komórki gospodarza indukowanej aktywności białka ADP (*ang. adenovirus death protein*) oryginalnie nazywanej E3-11.6K. ADP jest glikoproteiną błonową typu III (N_{endo}/C_{exo}). Mechanizm lizy komórki po zniszczeniu jądra przez aktywność ADP pozostaje nieznany, jednak pewnym jest, że białko to konieczne jest do wydajnego uwalniania wirusów [78-79]. Drugi możliwy sposób uwolnienia wirionów potomnych oparty jest na aktywności proteazy HAdV-5. Wykazano, że enzym ten zaburza system filamentów przez proteolizę komórkowej cytokeratyny K18, sprawiając tym samym, że zainfekowane komórki stają się podatne na lizę wskutek działania niewielkich sił mechanicznych [80]. Substratem dla proteazy HAdV-5 jest również aktyna i mikrotubule, stąd można przypuszczać, że aktywność proteolityczna narusza integralność całego cytoszkieletu. Równocześnie zahamowanie produkcji białek komórkowych przez selektywną translację mRNA HAdV-5 uniemożliwia naprawę uszkodzeń cytoszkieletu spowodowanych przez protezę HAdV-5 [81].

1.4. Hsp90

Białka szoku cieplnego (*ang. heat shock protein*) stanowią grupę białek związanych z przeżyciem komórki, odpowiedzią na stres jak również z ewolucją morfologiczną [82]. Hsp90 jest obecne w cytoplazmie wszystkich komórek eukariotycznych i stanowi 1-2% całkowitych

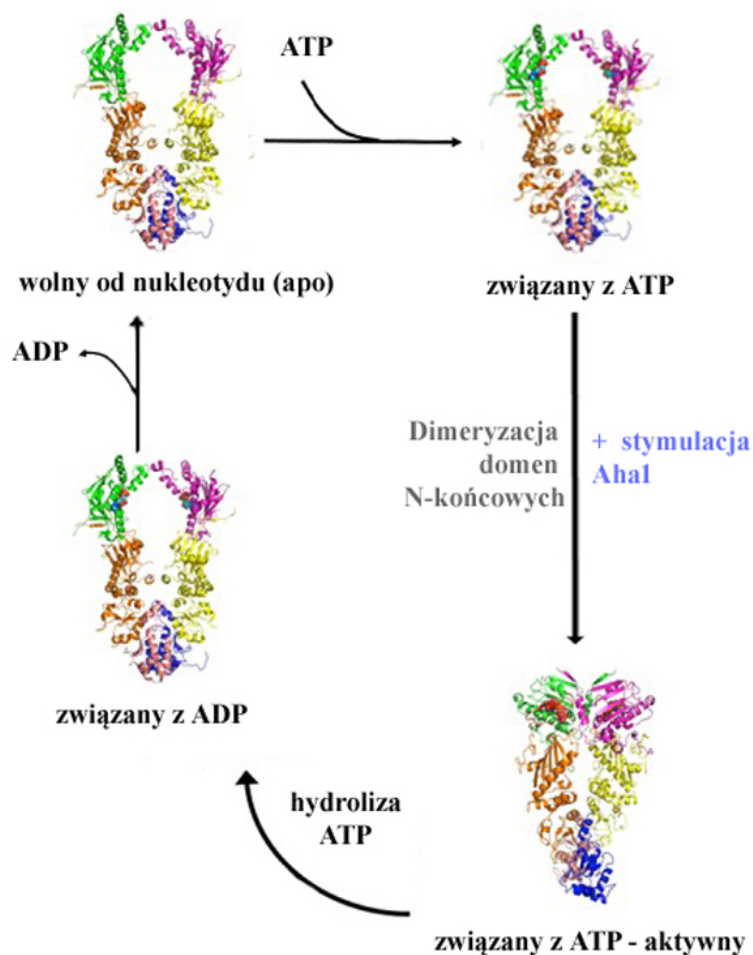
białek cytozolowych. Jego poziom może wzrastać w warunkach stresu do ~ 4-6%. Hsp90 uczestniczy w fałdowaniu i degradacji białek kolektywnie zwanych klientami. Białka klienci stanowią niejednorodną grupę do której należą m.in. kinazy białkowe, receptory hormonów steroidowych, czynniki transkrypcyjne i ligazy ubikwitynowe. Hsp90 składa się z trzech domen: C- i N-końcowej oraz domeny środkowej [83-84].

Domena N-końcowa (ND) zawiera miejsce wiązania ATP, jej struktura krystaliczna jest podobna do motywu Bergata, co pozwoliło na klasyfikację Hsp90 do rodziny ATPaz GHKL (Gyrase, Hsp90, Histidine Kinase, MutL) [85]. Domena środkowa (MD) służy jako miejsce wiązania substratów białek pomocniczych, jest niezbędna do katalitycznej aktywności ND, ponieważ umożliwia odpowiednią orientację grupy fosforanowej ATP [86]. Domena C-końcowa (CD) odpowiada za dimeryzację oraz zawiera sekwencje rozpoznające powtórzenia tetratrikopeptydowe (*TPR recognition sequence*), przez które zachodzi wiązanie Hsp70-Hsp90 i białka substratowego [84, 87]. Fragment łączący ND i CD określany jest jako "charged linker" (CL). Zapewnia on elastyczność między domenami i umożliwia zmiany konformacyjne Hsp90 podczas cyklu związanego z hydrolizą ATP i wiązaniem oraz uwalnianiem klientów. Istnieją trzy podrodziny Hsp90, a każda z nich znajduje się w różnych przedziałach komórkowych. Cytoplazmatyczne Hsp90 u kręgowców są kodowane przez dwa geny, nazywane historycznie izoformami HSP90 α i HSP90 β . Formy obecne w retikulum endoplazmatycznym i w mitochondriach to odpowiednio Grp94 i TRAP1. Sekwencja aminokwasowa Hsp90 α i Hsp90 β jest identyczna w 86% [82]. Do różnic między izoformami zaliczyć można sposób indukcji, miejsce występowania i funkcje pełnione w poszczególnych tkankach. Hsp90 α , którego ekspresja indukowana jest po ekspozycji na stres występuje w większej ilości w mózgu oraz w oocytach. W stanie fizjologicznym izoforma ta reguluje różnicowanie komórek mięśniowych danio przegowanego, zapewnia stabilność cyklozależnej kinazy cdc2 podczas odpowiedzi na stres termiczny, zaś w stanach patologicznych, podczas nowotworzenia umożliwia metastazę i migrację komórek rakowych [88-90]. Hsp90 β jest konstytutywnie wyrażaną izoformą, której przeważająca nad Hsp90 α ekspresja obserwowana jest w większości tkanek. Równą ilość omawianych izoform wykryto w komórkach HPT (*ang. human proximal tubule cells*) [91]. Izofoma Hsp90 β jest niezbędna we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego. Pełni również rolę w różnicowaniu trofoblastów, ponieważ u homozygotycznych myszy z delecją Hsp90 β , przy jednoczesnej niezmięnionej ekspresji Hsp90 α , obserwowano nieprawidłową budowę łożyska [92]. Wydaje się, że Hsp90 β odpowiada za przeżycie komórek nowotworowych MDA-MB-231, ponieważ nie udało się uzyskać komórki pozbawionej tego białka [91]. Hsp90 występuje w formie

dimeru. Z reguły obserwowane są kompleksy powstałe w wyniku homodimeryzacji $\alpha\alpha$ bądź $\beta\beta$. Stanowią one najczęściej występującą formę, jednak wykazano występowanie również heterodimerów $\alpha\beta$, monomerów bądź wyższych oligomerów *in vitro* [93].

1.4.1. Cykl ATPazowy

Aktywność Hsp90 zależna jest od tworzenia tzw. zacisku molekularnego (ang. *molecular clamp*), który zamyka się i otwiera w odpowiedzi na wiązanie i hydrolizę ATP. Badania krystalograficzne wykazały trzy odrębne stany konformacyjne: wolny od nukleotydu (apo), związany z ATP i związany z ADP [94]. Na początku cyklu katalitycznego, w stanie apo, homodimer Hsp90 pozostaje w konformacji otwartej, w kształcie litery V. Na tym etapie dochodzi do związania białka substratowego do domeny C-końcowej Hsp90. Substrat przekazywany jest przez tzw. kompleks wczesny złożony z Hsp70 i białka HOP. Następujący później „dojrzały kompleks” tworzony jest przez Hsp90 z białkiem substratowym i białkiem pomocniczym p23, przy jednoczesnym oddysocjowaniu Hsp70 i HOP [95-96]. Związanie ATP do ND prowadzi do stworzenia pośredniego stanu inicjującego zamknięcie nukleotydu w strukturze „*pocket*”. Proces ten przyspieszony jest przez dołączenie białka pomocniczego Aha1 do ND i MD [97]. Wiązanie ATP i jego hydroliza w każdym z monomerów Hsp90 zachodzi niezależnie od siebie. Na zamknięcie zacisku molekularnego składa się (i) całkowite zakrycie miejsca wiążącego strukturą „*lid*”; (ii) krzyżowe związanie nici β na ND poszczególnych monomerów Hsp90 co prowadzi do (iii) zbliżenia się do siebie domen ND i skrócenie MD względem siebie. Skutkuje to zamknięciem białka substratowego w świetle między domenami. Po hydrolizie ATP dochodzi do kolejnych zmian konformacyjnych, polegających na rozluźnieniu dimeru i oddysocjowaniu domen ND i MD. Towarzyszy temu jednoczesne uwolnienie ADP i wolnego fosforanu. Otwarcie zacisku molekularnego umożliwia rozpoczęcie kolejnego cyklu katalitycznego [93, 98].



Ryc.3. Cykl ATPazowy Hsp90.

1.4.2. Inhibitory Hsp90

Geldanamycyna jest inhibitorem kompetycyjnym Hsp90. Jej działanie polega na blokowaniu miejsca wiążącego ATP w domenie N-końcowej. Prowadzi to do zahamowania aktywności opiekuńczej Hsp90, która jest zależna od hydrolizy ATP. Geldanamycyna ze względu na toksyczność nie nadaje się jednak do zastosowania klinicznego. Posłużyła ona do syntezy bardziej aktywnych pochodnych – 17-AAG i 17-DMAG [99-100]. Oba związki, w porównaniu do geldanamycyny, wykazują lepszą rozpuszczalność, biodostępność, zmniejszoną toksyczność oraz większą selektywność względem komórek nowotworowych w stosunku do prawidłowej tkanki. 17-AAG okazał się skuteczny w zahamowaniu rozwoju metastatycznego czerniaka oraz w leczeniu raka piersi HER2 pozytywnego [101-103].

Jednak również w przypadku 17-AAG występuje ograniczenie związane z hepatotoksycznością wynikającą z obecności pierścienia chinonowego w strukturze związku, jak też problem z jego rozpuszczalnością. Dlatego też skierowano znaczne wysiłki na poprawę właściwości leków, bezpieczeństwa farmakoterapii i syntezy związków nowej generacji. Nowopowstałe związki podzielić można na 3 klasy zgodnie z ich podstawowymi

strukturami- związki purynowe (PU-H71, BIIB02, CUDC-305), związki rezorcynolowe (AT13387, STA-9090, NVP-AUY922) i benzamidowe (TAS-116, XL888, SNX-54220) [104].

Mimo, że dotychczas żaden z inhibitorów Hsp90 nie został zaaprobowany do użycia jako lek, wiele z nich włączono do badań klinicznych, z czego w trakcie trwania jest 12 rozpoczętych projektów zarówno w I i II fazie badań, zaś status rekrutujących posiada 7 projektów (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>). Na chwilę obecną trwają badania nad specyficznymi inhibitorami poszczególnych izoform białka opiekuńczego, które ograniczyć mają efekt zahamowania całej puli Hsp90. Wykazano zwiększoną cytotoksyczność i stłumione mechanizmy chroniące komórki nowotworowe podczas stosowania wspomnianych specyficznych wobec danej izoformy inhibitorów [105-106].

1.4.3. Hsp90 i wirusy

Podczas infekcji, wirus przejmuje kontrolę nad środowiskiem komórkowym kierując zasoby materiałów i energii na syntezę składników niezbędnych do efektywnej replikacji. Zmiana metabolizmu komórek na korzyść wirusa zależna jest od produkcji dużej ilości złożonych strukturalnie białek wirusowych. Tworzenie dużej ilości w pełni funkcjonalnych białek w przeciągu krótkiego czasu trwania infekcji wymaga zapobieganiu agregacji i nieprawidłowemu fałdowaniu. Wirusy w tym celu wykorzystują opiekuńcze białka komórkowe, w tym Hsp90. Do dotychczas opisanych klientów Hsp90 należą białka wirusowe, które w zależności od rodziny, uczestniczą w różnych procesach w przebiegu infekcji, począwszy od internalizacji, po uwolnienie wirionów potomnych z komórki gospodarza [107]. Podsumowanie znanych interakcji między Hsp90 a wirusami zostało zawarte w tabeli 1.

Tabela 1. Wykorzystanie Hsp90 przez wirusy na poszczególnych etapach infekcji [107]

| Rodzina | Wirus | Funkcja Hsp90 |
|-----------------------|--|--|
| <i>Herpesviridae</i> | Wirus opryszczki pospolitej typu 1 i 2 | Internalizacja wirusa, replikacja wirusa |
| | Wirus Epsteina-Barr | Ekspresja genów wirusowych, replikacja wirusa, zapobieganie apoptozie |
| | Ludzki Cytomegalowirus | Ekspresja genów wirusowych |
| | Wirus ospy wietrznej i półpaśca | |
| | Herpeswirus związany z mięśniakiem Kaposiego | |
| <i>Polyomaviridae</i> | Wirus SV40 | Replikacja wirusa |
| <i>Poxviridae</i> | Wirus krowianki | Składanie kapsydu, ekspresja genów wirusowych |
| <i>Reoviridae</i> | Reovirus | Wiązanie wirusa do komórki przez trimeryzację białka kapsydu |
| | Rotawirus | Dimeryzacja białka NSP3 wymaganego do regulacji translacji |
| <i>Birnaviridae</i> | Wirus zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza | Internalizacja wirusa |
| <i>Picornaviridae</i> | Wirus polio | Dojrzewanie białek, składanie i uwalnianie wirionów potomnych |
| | Rhinowirus | |
| | Wirus Coxackie | |
| <i>Flaviviridae</i> | Wirus dengi | Internalizacja wirusa |
| | Wirus zapalenia wątroby typu C | Replikacja wirusa, dojrzewanie białek, składanie i uwalnianie wirionów potomnych |

| | | |
|-------------------------|--|---|
| <i>Arenaviridae</i> | Wirus limfocytarnego zapalenia spłotu naczyńiówkowego i opon mózgowych | Prezentacja krzyżowa antygeny |
| <i>Nodaviridae</i> | Herpeswirus kotów | Replikacja wirusa |
| <i>Hepeviridae</i> | Wirus zapalenia wątroby typu E | Transport wewnątrzkomórkowy |
| <i>Rhabdoviridae</i> | Wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej Indiana | Replikacja wirusa, stabilizacja białek wirusa |
| <i>Paramyxoviridae</i> | Ludzki wirus paragrypy | Replikacja wirusa, stabilizacja białek wirusa |
| | Wirus SV5/41 | Stabilizacja białek wirusa |
| | Wirus Sendai | Aktywacja układu odporności wrodzonej |
| | Wirus odry | Zwiększona aktywność onkolityczna |
| <i>Bunyaviridae</i> | Wirus La Crosse | Stabilizacja białek wirusa |
| <i>Filoviridae</i> | Wirus Ebola | Replikacja wirusa |
| <i>Orthomyxoviridae</i> | Wirus grypy A | Replikacja wirusa, synteza RNA, dojrzewanie białek, składanie i uwalnianie wirionów |
| <i>Retrovirus</i> | Wirus ludzkiej białaczki z komórek T | Transkrypcja |
| | Ludzki wirus niedoboru odporności | |
| <i>Hepadnaviridae</i> | Wirus zapalenia wątroby typu B | Transkrypcja |

Oporność na leki przeciwwirusowe pojawia się w wyniku przedłużonej ekspozycji na stosowany lek, która skutkuje selekcją środowiskową opornych szczepów. Jest to coraz większy problem w populacji pacjentów z obniżoną odpornością [108-109]. Rozwiązaniem jest projektowanie związków skierowanych na czynniki komórkowe gospodarza

uczestniczące w procesie infekcji poszczególnych wirusów [110]. Hsp90 stanowi potencjalny cel leków przeciwwirusowych, ze względu na jego kluczową rolę w cyklu życiowym wielu patogenów. Oddziałuje on z kluczowymi białkami wirusów, aby zachować ich stabilność i ułatwić transport wewnątrzkomórkowy. Wykorzystanie inhibitorów Hsp90 nie skutkuje powstawaniem szczepów opornych, jak również nie są generowane mutacje w obrębie białka komórkowego będącego klientem Hsp90 [111-112]. Dodatkowo, zaletą stosowania Hsp90 jako celu terapeutycznego jest fakt, że uczestniczy on w wielu etapach w przebiegu infekcji, podczas gdy tradycyjne leki przeciwwirusowe z reguły ukierunkowane są na jeden komponent wirusa.

2. HIPOTEZA I CEL PRACY

Dane literaturowe wskazują, że aktywność opiekuńcza Hsp90 obserwowana jest na niemalże każdym etapie namnażania wszystkich przebadanych do tej pory grup wirusów. Wykazano, że omawiane białko uczestniczy w procesie adsorpcji i internalizacji jak ma to miejsce w przypadku wirusa Dengi [113]. Ponadto, Hsp90 oddziałuje bezpośrednio z polimerazą wirusów takich jak wirus zapalenia wątroby typu B, wirus grypy A i wirus opryszczki pospolitej, umożliwiając tym samym proces replikacji materiału genetycznego [114-116]. Etapy końcowe, polegające na dojrzewaniu białek strukturalnych budujących wiriony potomne, również zależne są od Hsp90, co wykazano na przykład dla wirusów z rodziny *Picornaviridae* [111].

Jako podstawę tego projektu przyjęto hipotezę, że zahamowanie aktywności białka opiekuńczego będzie miało wpływ na przebieg infekcji HAdV-5. Ponieważ aktywność opiekuńcza Hsp90 skupia się na wybranych białkach, założono, że efekt zahamowania replikacji HAdV-5 będzie związany z zakłóceniem funkcjonowania lub ekspresji określonych białek wirusowych.

Celem pracy było określenie roli Hsp90 w przebiegu cyklu życiowego HAdV-5. W ramach weryfikacji postawionej hipotezy zrealizowano następujące zadania badawcze:

- Wskazanie konkretnego etapu replikacji HAdV-5 zależnego od Hsp90, którego zahamowanie będzie widoczne po dodaniu specyficznego inhibitora 17-allylamino-17-demetoksygeldanamycyny. Badane stadia obejmowały wczesne procesy takie jak wiązanie HAdV-5 do powierzchni komórki gospodarza, ekspresję genów wczesnych jak również etapy obejmujące ekspresję genów późnych.
- Ocena zmian poziomu całkowitego białka HAdV-5 w obecności 17-AAG, jak również analiza ekspresji sklonowanych pojedynczych białek wirusa.
- Ocena poziomu ekspresji DNA i RNA poszczególnych genów, których ekspresja reprezentuje określone stadia życiowe HAdV-5.
- Zbadanie interakcji między Hsp90 a białkami-klientami pochodzenia wirusowego.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Hodowle komórkowe i inhibitor

3.1.1. Hodowle komórkowe

Linie ludzkich embrionalnych komórek nerki (HEK293), jak również adenokarcynomiczne ludzkie komórki nabłonka podstawnego pęcherzyków płucnych (A549) hodowano w medium IMDM (*ang. Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, PanReac AppliChem) z dodatkiem 10% inaktywowanej termicznie surowicy FBS (*ang. heat inactivated fetal bovine serum*, Eurx) oraz 1% mieszaniny antybiotyków Penicylina-Streptomycyna (Sigma). Obie linie hodowano w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂.

3.1.2. 17-AAG

W przypadku eksperymentów obejmujących traktowanie komórek 17-AAG, przygotowano odpowiednie rozcieńczenia odczynnika (0,025-4 μM) w pożywce IMDM. Inhibitor dodawano do zainfekowanych hodowli A549 i HEK293 w odpowiednich punktach czasowych.

3.1.3. Krzywa przeżywalności

Test kolorymetryczny Cell-Counting kit-8 (Sigma) zastosowano do oceny żywotności komórek po dodaniu wirusa lub inhibitora 17-AAG w hodowli A549, zgodnie z instrukcjami producenta. Wartości odczytywano na czytniku płytek Lumistar.

3.2. Infekcja wirusem i traktowanie 17-AAG

3.2.1. HAdV-5

Ludzkiego adenowirusa 5 (VR-5) pozyskano z ATCC (*ang. American Type Culture Collection*).

3.2.2. Infekcja HAdV-5

Komórki A549 i HEK293 wysiano na szalki hodowlane 24 godziny przed infekcją, uzyskując konfluencję 60-80%. Bezpośrednio przed zakażeniem hodowli, medium usunięto i warstwę komórek przemyto PBS. Zależnie od prowadzonego doświadczenia przygotowano różne rozcieńczenia wirusa w odpowiedniej objętości IMDM. Komórki inkubowano z wirusem przez 1 godzinę w 37°C. Po zakończonej inkubacji, medium z niezwiązanym wirusem odpłukano i zastąpiono świeżym IMDM z mieszaniną antybiotyków pen-strep. Zainfekowane komórki, zależnie od eksperymentu hodowano z 17-AAG bądź bez inhibitora i zebrano lub utrwalono we wskazanych punktach czasowych przed lub w trakcie infekcji.

3.2.3. Propagacja wirusa

Namnażanie HAdV-5 prowadzono w linii HEK293 na szalkach hodowlanych o średnicy 10 cm. Komórki rozsiewano, następnie po 24 godzinach zakażano wirusem jak opisano w punkcie 3.2.2. Hodowla prowadzona była przez 72 godziny, do momentu mikroskopowej obserwacji efektu cytopatycznego. Po tym czasie medium było usuwane, a zainfekowana monowarstwa HEK293 zawieszana w PBS i przenoszona do probówki. W celu zniszczenia struktur komórkowych i uwolnienia wirusa do roztworu, zawiesinę poddano 3 cyklom mrożenia i rozmrażania. Komórkowy osad odwirowano, a nadsącz stężonego wirusa podzielono na porcje i przechowywano w -80°C .

3.2.4. Barwienie immunofluorescencyjne AdV5

Aby zobrazować wpływ inhibitora na HAdV5 w zakażonych liniach, komórki A549 rozsiano na szkiełka podstawowe. Po 24 godzinach, linie zainfekowano HAdV-5 500 TCID₅₀/ml. Hodowle kontynuowano przez kolejne 24 godziny bez inhibitora, jak również w obecności 0,25 μM 17-AAG. Do utrwalenia komórek wykorzystano 4% paraformaldehyd, w którym inkubowano komórki 20 minut. Następnie, komórki przepłukano w celu wymycia formaldehydu i permeabilizowano w buforze PBST (PBS, 1% Triton X-100). Miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciała zablokowane zostały przez 10 min inkubację w 3% BSA (*ang. bovine serum albumin*) w PBS. Szkiełka pokryte zostały mieszaniną 1% surowicy z I-rzędowym Ab rozpoznającym białka kapsydu HAdV-5 na 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Nadmiar przeciwciał wypłukano PBST i komórki inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi związanym z Alexa Fluor-488 przez kolejną godzinę, a następnie trzykrotnie przemyto PBS. W celu wizualizacji jądra na wybarwione komórki naniesiony został roztwór DAPI (VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI). Analiza mikroskopowa przeprowadzona była z użyciem mikroskopu Nikon i oprogramowania producenta mikroskopu (Image Pro Plus).

3.2.5. Badanie internalizacji AdV5

Komórki A549 wysiano na szkiełka podstawowe i hodowano przez 24 godziny w 37°C . Po tym czasie medium usunięto i zastąpiono świeżym IMDM w komórkach kontrolnych bądź IMDM z dodatkiem 0,5 μM 17-AAG. Komórki kontrolne i badane inkubowano przez kolejne 4 godziny. Następnie medium usunięto, monowarstwę komórek przepłukano zimnym PBS a płytki umieszczono na lodzie. Przy obniżonej temperaturze do hodowli dodano HAdV-5 w stężeniu 500 TCID₅₀/ml. Następnie zakażone hodowle umieszczono w cieplarni w 37°C i inkubowano odpowiednio 15 i 30 minut. Po tym czasie,

płytki ponownie umieszczono na lodzie w celu zatrzymania procesu internalizacji. Niezwiązanego wirusa odpłukano zimnym PBS i komórki utrwalono oraz barwiono analogicznie do procedury opisanej w punkcie 3.2.4.

3.2.6. Ultrawierowanie w gradiencie CsCl

Ultrawierowanie w gradiencie CsCl przeprowadzono zgodnie z procedurą Seidman i wsp., 1979 [117]. Komórki A549 hodowane na dużą skalę, w butelkach hodowlanych o powierzchni wzrostu 75cm², zakażono wirusem 1000 TCID₅₀/ml w obecności 0,5 μM 17-AAG, jak również bez inhibitora. Zbiór HAdV-5 dokonywano po 48 godzinach przy widocznym 100% efekcie cytopatycznym. Wirusy wewnątrzkomórkowe uwolniono z komórek na drodze zamrażania i rozmrażania. Nadsącz uzyskany po odwirowaniu debris komórkowego umieszczono w probówce do ultrawierowania. Do probówek na dno strzykawką dodano kolejno roztwory CsCl o gęstości 1,2 i 1,4 mg/ml, uzyskując stopniowy gradient gęstości. Próbkę wirowano 30000 g w 4°C przez 3 godziny w celu rozdzielenia frakcji kompletnego wirusa i pustych kapsydów.

3.3. Metody biologii molekularnej

3.3.1. Izolacja DNA AdV5

DNA HAdV-5 izolowano z użyciem zestawu Quick Blood DNA purification, Eurx. W tym celu komórki wysiano na płytki i hodowano przez 24 godziny do ich adhezji. Następnie po kolejnych 24 godzinach zakażono HAdV-5 i traktowano odpowiednim stężeniem 17-AAG. Przed izolacją komórki przemywano PBS i lizowano w buforze z proteinazą K. Lizat przeznaczony był do dalszej izolacji zestawem.

3.3.2. Izolacja RNA AdV5

Całkowite RNA zainfekowanych komórek A549 zostało wyizolowane z użyciem odczynnika RNA Extracol (Eurx) według procedury Chomczyńskiego i Sacchi [118]. Pożywkę hodowlaną usunięto, komórki przepłukano PBS i poddano lizie w 0,8 ml odczynnika RNA Extracol. Próbkę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej poczym do supernatantu dodano 0,2 ml chloroformu. Próbkę inkubowano 3 minuty w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano do rozdziału faz. W celu precypitacji RNA, do górnej frakcji wodnej dodany został izopropanol (1:1). Po wytrąceniu RNA poprzez wirowanie 14000g 15 minut, izopropanol został usunięty, a osad został przepłukany 70% etanolem, a następnie zawieszony w odpowiedniej objętości wody wolnej od nukleaz.

3.3.3. Ilościowe oznaczanie stężenia kwasów nukleinowych metodą spektrofotometryczną

Stężenie DNA i RNA oznaczano metodą spektrofotometryczną za pomocą urządzenia Nanodrop. Pomiar absorpcji wykonywano przy długości fali 230 nm, 260 nm i 280 nm w celu pomiaru stężenia kwasu nukleinowego oraz oceny jego czystości.

3.3.4. Izolacja DNA HAdV-5 z medium i komórek

Komórki A549 zakażono HAdV-5 i hodowano w 0,5 μ M 17-AAG bądź bez inhibitora przez 48 godzin. Medium z komórek zebrano i wirowano 5 minut 2000 rpm. Komórki odpłukano z szalki z użyciem PBS, następnie zawiesinę poddano trzem cyklom zamrażania-rozmrażania i odwirowano resztki komórek. Do medium oraz do nadsącza komórek dodano 1/5 objętości 50% PEG8000 w celu wytrącenia wirusa. Probówki worteksowano do wymieszania PEG8000, a następnie wirowano 15 minut 14000 rpm. Osad zawieszono w PBS i po raz kolejny poddano precipitacji z użyciem PEG8000. Po usunięciu odwirowanego supernatantu, wytrącony osad zawierający cząstki wirusa trawiono przez godzinę proteinazą K w buforze zawierającym 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0,5% SDS. DNA izolowano za pomocą zestawu Quick Blood DNA purification, Eurx.

Tabela 2. Sekwencje primerów stosowanych do klonowania

| Nazwa primera | Sekwencja 5'→3' |
|---------------|---|
| ADP-F | GGGTGCTTAAGATGGAGCGAAGAAACCCATCTGA |
| ADP-R | GGGTGCTCGAGATCTGTATCTTCATCGCTAGAGCCA |
| E1A289R-F | CGGCGGTACCATGAGACATATTATCTGCCACG |
| E1A289R-R | GCGCCCTCGAGTGGCCTGGGGCGTTTACAG |
| 52K-F | CGCTGGCTAGCATGCATCCGGTGCTGCGGCA |
| 52K-R | GCACCCTCGAGGTA ^{CTCGCCGTCCTCTGGCT} |
| III-F | GCTCTGGTACCATGATGCAAGACGCAACGGAC |
| III-R | GCACCCTCGAGAAAAGTGC GGCTCGATAGGAC |
| V-F | AATGTCCAAGCGCAAAATCAAAG |
| V-R | GCACCCTCGAGAACGATGCTGGGGTGGTA |
| E1B19K-F | GGGTAAGCTTATGGAGGCTTGGGAGTGTTTGG |
| E1B19K-R | GGGACTCGAGTTC ^{CCGAGGGTCCAGGC} |
| UXP-F | GGGTCGGTACCATGAAGATAGTGGGTGCGGAT |
| UXP-R | GGGAGCTCGAGCCTCCTTTGCCATGCTTGAT |
| E3GP19K -F | GGGTCAAGCTTATGATTAGGTACATAATCCTAGGT |
| E3GP19K-R | CCCACCCTCGAGAGGCATTTTCTTTTCCTCAATA |
| PVII-F | TGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCATGAGCAAGGAAATCCCAC |
| PVII-R | GGTGACTCGAGTCTTGCAATGTAGTTGCGC |
| Protease-F | AATGGGCTCCAGTGAGCAG |
| Protease-R | GCACCCTCGAGCATGTTTTTCAAGTGACAAAAAG |
| 100K-F | CCCCTTAAGATGGAGTCAGTCGAGAAGAAG |
| 100K-R | CCCTCGAGCGGCCCGCCGGTTGGGTGCGC |
| PTP-F | GGGTGGTACCATGGCCTTGGTGAGCGTCAACGATTGCGCG |
| PTP-R | GGGTGGATCCGCGGCCGCTTATAAAAGCGGTGACGC |
| IVa2-F | GGGCTGGTACCATGGAAACCAGAGGTCTGAAGACCGGCAGCGCTTC |
| IVa2-R | GGCCTCTCGAGTTT ^{AGGGGTTTTGCGCGC} |
| 33K-F | GGCGGGGTACCATGGCACCCAAAAAGAAGC |
| 33K-R | CCGCCCTCGAGTCTTAAGAGTCAGCGCG |
| PIIIa-F | GCACGGGTACCATGATGCAAGACGCAACG |
| PIIIa-R | GCTCGCTCGAGAAACATTCTCCCCAGCCT |
| DBP-F | GCAGCGGTACCATGGCCAGTCGGGAAGAG |
| DBP-R | GCACCCTCGAGAAAATCAAAGGGGTTCTGCC |
| PVI-F | CGACGGGTACCATGGAAGACATCAACTTTGCG |
| PVI-R | CACTCCTCGAGGAAGCATCGTCGGCGCTTC |
| Polymerase-F | GCACGTCTTAAGATGGCCTTGGCTCAAGCT |
| Polymerase-R | GACCTCGATATCCTCGGCATCTCGATCCAGCAT |

| | |
|-------------------|---|
| Hexon - F | TGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTT <u>GGTACCAT</u> GGCTACCCCTTCGATG |
| Hexon - R | TTCAGAAATCAACTTTTGTTCACCCTCGAGTGTGTGGCGTTGCCGGC |
| Fiber - F | TGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTT <u>GGTACCAT</u> GAAAGCGCGCAAGACC |
| Fiber -R | TTCAGAAATCAACTTTTGTTCACCCTCGAGTTCTTGGGCAATGTATGAA |
| Penton – F | AATGCGGCGCGCGGCGATGTATGA |
| Penton -R | GCACCCTCGAGAAAAGTGC GGCTCGATAGGAC |

Tabela 3. Sekwencje primerów stosowanych do półościowego PCR

| Nazwa primera | Sekwencja 5'→3' |
|----------------|-------------------------|
| E1A-F | TTGTCATTATCACCGGAGGAA |
| E1A-R | TCACCCACTGCCATAATTT |
| DBP-F | TAATCAAGCATGGCAAAGGAG |
| DBP-R | AATTTCACTTTCCGCTTCG |
| Hexon-F | GGACGCCTCGGAGTACCTGAG |
| Hexon-R | ACAGTGGGGTTTCTGAACTTGTT |
| G6PD-F | TGAATGATGCAGCTCTGATCC |
| G6PD-R | CACGATGATGCGGTTCCA |

Tabela 4. Sekwencje primerów stosowanych w Real-time PCR

| Nazwa primera | Sekwencja 5'→3' |
|-------------------|------------------------|
| E1A-RT-F | CCGAAGATCCCAACGAGGAG |
| E1A-RT-R | GAAACCGGACCCAAGGCT |
| Hexon-RT-F | CGCAGTGGTCTTACATGCAC |
| Hexon-RT-R | GTTGTAGGCAGTGCCAGAGTAG |
| G6PD-RT-F | GGCTGGGGCTCATTTGCAG |
| G6PD-RT-R | TCCAGGGGTCTTACTCCTTGG |

Tabela 5. Sekwencje primerów do mutagenezy

| Nazwa primera | Sekwencja 5'→3' |
|--------------------|-----------------------------------|
| Hsp90E46A-F | GAGATTTTCCTTCGGGCGTTGATCTCTAATGCT |
| Hsp90E46A-R | AGCATTAGAGATCAACGCCCGAAGGAAAATCTC |

3.3.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Uzyskane całkowite RNA stanowiło matrycę do reakcji odwrotnej transkrypcji. Reakcja ta przeprowadzana była z użyciem 1µg RNA. Do syntezy cDNA użyty został

komercyjnie dostępny zestaw NG dART RT kit (Eurx). Do inicjacji reakcji jako primerów dla odwrotnej transkryptazy użyto mieszaniny losowych hexamerów lub Oligo(dT)₂₀, zapewniając tym samym syntezę z całkowitego RNA lub mRNA. Objętości poszczególnych odczynników wymieniono w tabeli 6. Przygotowaną mieszaninę reakcyjną ogrzewano do 25°C i inkubowano przez 10 minut, następnie temperaturę podnoszono do 50°C i inkubowano 1 godzinę.

Tabela 6. Składniki reakcji odwrotnej transkrypcji

| Składnik | Objętość [μl] |
|---|---------------|
| Bufor 5 x NG cDNA | 4 |
| Random hexamers lub Oligo(dT) ₂₀ | 1 |
| RNA (10 ng-5 μg) | 2 |
| NG dART RT Mix | 1 |
| RNase-free H ₂ O | 11 |
| Objętość końcowa | 20 |

3.3.6. Półilościowy PCR

Zmiany ilości mRNA E1A, DBP i hexon, reprezentujących odpowiednio geny wczesne, pośrednie i późne analizowano w pół ilościowej reakcji PCR. Do zakażonych HAdV-5 komórek A549, w 2, 4, 6, 8, 12, 15 i 24 godzinie od infekcji dodawano 0,5μM 17-AAG. Uzyskane cDNA stanowiło matrycę do reakcji PCR. Poszczególne fragmenty amplifikowano z użyciem Taq Polimerazy (A&A Biotechnology) w 20 μl mieszaninie reakcyjnej o składzie opisanym w tabeli 7.

Tabela 7. Składniki reakcji półilościowego PCR

| Składnik | Objętość [μl] |
|-------------------------|------------------|
| 2.5 mM dNTP | 2 |
| 10x bufor reakcyjny | 2 |
| 100 μM primer F | 0,1 |
| 100 μM primer R | 0,1 |
| cDNA | 1 μl (0.25-1 μg) |
| H ₂ O | 14,8 μl |
| Objętość końcowa | 20 |

Sekwencje primerów użytych w doświadczeniu znajdują się w tabeli 3. Ilość cykli została ograniczona w celu zapobiegania saturacji reakcji PCR. Do amplifikacji żadnego z badanych

genów ilość cykli nie przekroczyła 25, umożliwia to zaobserwowanie zmian w ilości amplikonów w poszczególnych punktach czasowych.

3.3.7. Ilościowy PCR (qPCR)

Różnice w ilości DNA w zakażonych komórkach i medium określone zostały podczas ilościowej reakcji Real-time PCR. Reakcja prowadzona była w aparacie Step One, Applied Biosystems i analizowana w odpowiednim oprogramowaniu. Detekcja sygnałów z amplikonów oparta była o fluorescencję barwnika SybrGreen (5xHOT FIREPol EvaGreen qPCR mix Plus ROX, Solis BioDyne). Do reakcji użyte zostały primery zaprojektowane w oparciu o sekwencję genu hexon i E1A. Stężenie DNA HAdV-5 obliczane były z krzywej standardowej DNA HAdV-5 wyznaczonej z rozcieńczeń dziesiętnych i normalizowane względem GAPDH. W analogiczny sposób analizowano zmiany ilościowe mRNA E1A w obecności 17-AAG jak i bez inhibitora. W tej reakcji matrycę stanowiło cDNA E1A pozyskane po izolacji całkowitego RNA zainfekowanych komórek. Bezwzględne wartości ekspresji dla mRNA E1A wyznaczono z krzywej i normalizowano względem GAPDH. Primery użyte w doświadczeniu wymienione są w tabeli 4, a skład mieszaniny reakcyjnej w tabeli 8.

Tabela 8. Składniki reakcji ilościowego PCR

| Składnik | Objętość [μl] |
|-------------------------|---------------|
| 5x qPCR Mix | 4 |
| 100 μM primer F | 0,1 |
| 100 μM primer R | 0,1 |
| DNA/cDNA | 1 |
| H ₂ O | 11 |
| Objętość końcowa | 20 |

3.4. Przygotowanie plazmidów

3.4.1. PCR

Plazmidy kodujące białka HAdV-5 z metką Myc, znajdujące się pod kontrolą promotora CMV w wektorze pcDNA, skonstruowano z użyciem enzymów restrykcyjnych. Klonowane fragmenty kodujące białka pozyskano w reakcji PCR, gdzie matrycę do reakcji stanowiło wyizolowane DNA HAdV-5, a w przypadku genów posiadających introny, cDNA. Fragmenty E1A otrzymano w wyniku reakcji PCR z całkowitego cDNA ze specyficznymi primerami wymienionymi w tabeli 1. Wprowadzały one unikalne sekwencje rozpoznawane

przez enzymy restrykcyjne. Do reakcji amplifikacji użyta została polimeraza KOD (KOD Hot Start DNA Polymerase, Novagen), która posiada aktywność 3'→5' egz nukleazy i cechuje się mniejszą częstością mutacji podczas reakcji PCR. W przypadku primerów zamieszczonych w tabeli 2, gdzie sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne nie zostały oznaczone, tępy koniec powstający w wyniku reakcji PCR był ligowany z wektorem trawionym EcoRV.

3.4.2. Klonowanie

Produkty amplifikacji oczyszczano zestawem (PCR/DNA Clean-Up Purification Kit, Eurox). Następnie wektor pcDNA-Myc, jak również otrzymane fragmenty DNA HAdV-5 trawiono odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi.

3.4.3. Ligacja

Powstanie lepkich końców po trawieniu umożliwia związanie komplementarnych sekwencji wektora i insertu w procesie ligacji. Do ligacji użyto T4 ligazy faga, a reakcję prowadzono 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Do procesu użyto wektor i insert w stosunku molowym 1:4. Ilość użytego wektora wynosiła 50 ng.

3.4.4. Transformacja komórek kompetentnych *E.coli* szczep XL-1

Komórki chemikompentne *E.coli*, zdolne do wiązania i pobierania obcego DNA bezpośrednio z roztworu, przygotowano z użyciem CaCl₂ zgodnie z protokołem opisanym przez Seidman i wsp 2001 [119]. Po zakończonym procesie ligacji konstrukt DNA, złożony z wektora i pełnego insertu, wprowadzono do bakterii kompetentnych w procesie transformacji. Mieszanina transformacyjna składająca się z 50 µl XL-1 i DNA inkubowana była na lodzie przez 15 minut. Następnie komórki bakteryjne poddane były szokowi cieplnemu w 42°C przez 2 minuty. Po wyjęciu z termobloku, do mieszaniny dodano 400 µl płynnego LB bez antybiotyku. Probówka następnie inkubowana była z wytrząsaniem przez 1 godzinę w 37°C w celu wywołania ekspresji genów z plazmidu. Do dalszej selekcji klonów pozytywnych, 50-100 µl mieszaniny bakterii wysiewane było na podłoże stałe z antybiotykiem selekcyjnym dla wektora pcDNA- ampicyliną i hodowane w 37°C przez noc.

3.4.5. Kolonijny PCR

Weryfikacji obecności insertu w przyjętym przez bakterie plazmidzie dokonano podczas reakcji kolonijnego PCR. W tym celu pojedyncze kolonie zbierane były ze stałego podłoża agarozowego i stanowiły inokulum do zaszczepienia 10 µl LB z antybiotykiem. Założone w 1,5 ml probówkach typu Eppendorf hodowle inkubowane są z wytrząsaniem 3 godziny w 37°C. Następnie, 1 µl zawiesiny użyto jako matrycę do reakcji PCR z primerami zewnętrznymi odpowiednio 243R F i 243R R oraz 289R F i 289R R. Kontrolę reakcji

stanowiła reakcja z użyciem bakterii transformowanych wektorem pcDNA-Myc. Amplifikacja fragmentu DNA o oczekiwanej wielkości była potwierdzeniem obecności sklonowanego insertu w plazmidzie.

3.4.6. Namnażanie plazmidów

Klony zidentyfikowane jako pozytywne, czyli posiadające plazmid z insertem, posłużyły jako inokulum do namnożenia plazmidu w 10 ml medium płynnego z ampicyliną. Izolacja plazmidu była przeprowadzona z użyciem komercyjnie dostępnego zestawu plazmid mini (A&A Biotechnology), zgodnie z instrukcjami producenta. Stężenie plazmidu po izolacji mierzono spektrofotometrycznie. Z wyizolowanych i oczyszczonych plazmidów, wprowadzenie insertu potwierdzono poprzez trawienie odpowiednimi enzymami restrykcyjnym i elektroforetyczny rozdział produktu trawienia.

3.4.7. Mutageneza

Konstrukcja plazmidu kodującego gen Hsp90 z dołączoną metką FLAG została opisana wcześniej [120]. Mutacja Hsp90 α E46A została wygenerowana przez mutagenezę PCR. Plazmid został użyty do reakcji PCR z primerami zawierającymi zmianę sekwencji generującą mutację. Produkt PCR został strawiony enzymem DpnI, w celu degradacji plazmidu użytego jako matrycy. Dodatkowo, do reakcji dodano kinazę polinukleotydową, która dodaje reszty fosforanowe na końcach produktu PCR. Ten zabieg miał na celu zwiększenie wydajności transformacji bakterii produktem PCR. Po transformacji wyizolowano z klonów bakterii plazmidy i potwierdzono obecność oczekiwanej mutacji sekwencjonowaniem.

3.4.8. Sekwencjonowanie

Poprawność sekwencji insertu sprawdzono na drodze sekwencjonowania. Wyizolowany i oczyszczony plazmid z dodatkiem uniwersalnych dla stosowanego wektora pcDNA, sekwencjonowano w Pracowni Sekwencjonowania IBB PAN.

3.5. Ekspresja białek

3.5.1. Transfekcja

Komórki HEK293 i A549 o konfluencji ~70%, na szalkach hodowlanych o średnicy 10 cm, kotransfekowane były plazmidami kodującymi białka HA Δ V-5 lub Hsp90 α E46A. Do procesu użyty został odczynnik Metafectane Pro (Biontexas), zgodnie z instrukcjami producenta.

3.5.2. Izolacja białka

Hodowle komórek poddawane lizie, umieszczano na lodzie i płukano zimnym PBS. Następnie dodawano bufor lizujący (25 mM Tris pH 7,6, 1 mM ATP, 0,5% Triton X-100) z dodatkiem inhibitorów proteaz (Roche). Lizaty przenoszono do probówek typu Eppendorf i wirowano 15 minut, 14000 rpm w 4°C. Supernatanty przenoszono do nowych probówek z 1xSDS Loading buffer z dodatkiem β -merkaptoetanolu i denaturowano 10 minut w 95°C. Stężenie białka oznaczano metodą BCA.

Tabela 9. Lista użytych przeciwciał

| Przeciwciało | Zastosowanie |
|--------------------------------------|-------------------------|
| Adenovirus type 5 (abcam) | WB, immunofluorescencja |
| CAR (Cell signaling) | WB, immunofluorescencja |
| Integrin α V (Cell signaling) | WB |
| Adenovirus E1A,M58 (Santa Cruz) | WB, immunofluorescencja |
| c-myc, (Merck) | WB, immunofluorescencja |
| FLAG (Sigma-Aldrich, F3165) | WB |
| Alexa Fluor 488 (Invitrogen) | Immunofluorescencja |
| Alexa Fluor 594 (Invitrogen) | Immunofluorescencja |
| GAPDH | WB |

3.5.3 Badanie ekspresji receptorów CAR i receptorów integrynowych α V

Komórki A549 hodowano przez 24 godziny w 37°C w medium z dodatkiem 17-AAG bądź bez inhibitora. Po tym czasie inkubacji hodowle poddano lizie zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.5.2 bądź utrwalono i barwiono immunofluorescencyjnie analogicznie do metody opisaną w rozdziale 3.2.4. Do analizy wykorzystywano przeciwciała rozpoznające receptory CAR i receptory integrynowe, wymienione w tabeli 9.

3.5.4. Barwienie immunofluorescencyjne ADP

Komórki A549 zgodnie z metodą opisaną w punkcie 3.5.1. transfekowane były przejściowo plazmidem kodującym białko ADP z dołączoną metką Myc. Transfekowane hodowle kontrolne prowadzono w medium bez inhibitora, zaś do komórek badanych dodano 0,5 μ M 17-AAG. Po 8, 12 i 16 godzinach hodowle utrwalono i barwiono immunofluorescencyjnie zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.2.4. Do analizy wykorzystywano przeciwciało rozpoznające peptyd Myc, wymienione w tabeli 9.

3.5.5. Barwienie immunofluorescencyjne E1A

Do porównania ekspresji E1A wykorzystano dwie linie komórkowe A549 i HEK293. Komórki A549 transfekowano zgodnie z procedurą 3.5.1. Hodowle następnie inkubowano przez 24 godziny w medium bez inhibitora i w obecności 0,5 μ M 17-AAG. Po kolejnych 24 godzinach komórki utrwalono i barwiono immunofluorescencyjnie zgodnie z opisaną procedurą 3.2.4. Do wizualizacji użyto przeciwciała specyficznego rozpoznającego białko E1A (tabela 9).

3.5.6. Hamowanie ekspresji białek cykloheksymidem (CHX)

W celu określenia czy dodatek inhibitora Hsp90 wpływa na degradację białka E1A, do hodowli komórek HEK293 dodano IMDM z CHX o końcowym stężeniu 100 μ g/ml, jak również kombinację 100 μ g/ml CHX z 500 nM 17-AAG. Od momentu dodania inhibitorów komórki inkubowano przez 9 i 24 godziny w 37°C. W wymienionych punktach czasowych hodowle poddano lizie zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.5.2.

3.5.7. Koimmunoprecypitacja (co-IP)

Do immunoprecypitacji wykorzystano komórki HEK293 transfekowane plazmidami kodującymi izoformy E1A w połączeniu z mutantem Hsp90 α E46A. Po 24 godzinach od transfekcji do jednego zestawu kotransfektanów każdej izoformy E1A dodano 0,5 μ M 17-AAG, podczas gdy drugi zestaw hodowany był w medium IMDM bez dodatku inhibitora. Po kolejnych 24 godzinach komórki zlizowano w buforze do IP (0,25% Triton X-100, 10 mM Tris, 20 mM NaF, 5 mM ATP i inhibitory proteaz). Frakcję nierozpuszczalną oddzielono przez wirowanie 12000 g w 4°C przez 15 minut, a następnie supernatant podzielono na dwie frakcje. Pierwszą stanowiły lizaty komórkowe, drugą poddawano dalszej procedurze IP. Lizaty denaturowane były w buforze 1xSDS Loading buffer przez 5 minut w 95 °C w obecności β -merkaptetanolu. Frakcja IP nanoszona była na minikolumny wypełnione 10 μ l kulek agarozowych związanych kowalencyjnie z przeciwciałem rozpoznającym metkę FLAG (Merck). Immunokompleksy inkubowano w 4°C mieszając przez 2 godziny. Następnie, niezwiązane do przeciwciał białka odpłukiwano PBS. Elucję immunokompleksów prowadzono z użyciem 40 μ l 1xSDS Loading buffer. Dalsza analiza związanych białek przebiegała z użyciem techniki WB.

3.5.8. SDS-PAGE i immunodetekcja

Do rozdzielania elektroforetycznego próbek używano 10% żelu PAA. Następnie, białka transferowano na membranę nitrocelulozową, którą następnie inkubowano w 5% mleku odtłuszczonym w celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał przez membranę.

Membranę z przeciwciałami (tabela 9) inkubowano mieszając przez noc w 4°C bądź przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończonej inkubacji niezwiązane przeciwciała odpłukiwano PBS. Wizualizacja przeprowadzana była po inkubacji z przeciwciałem II-rzędowym związanym z peroksydazą chrzanową, z użyciem systemu Fusion FX Vilber bądź ChemiDoc Imaging System (Bio Rad).

3.5.9. Analiza densytometryczna

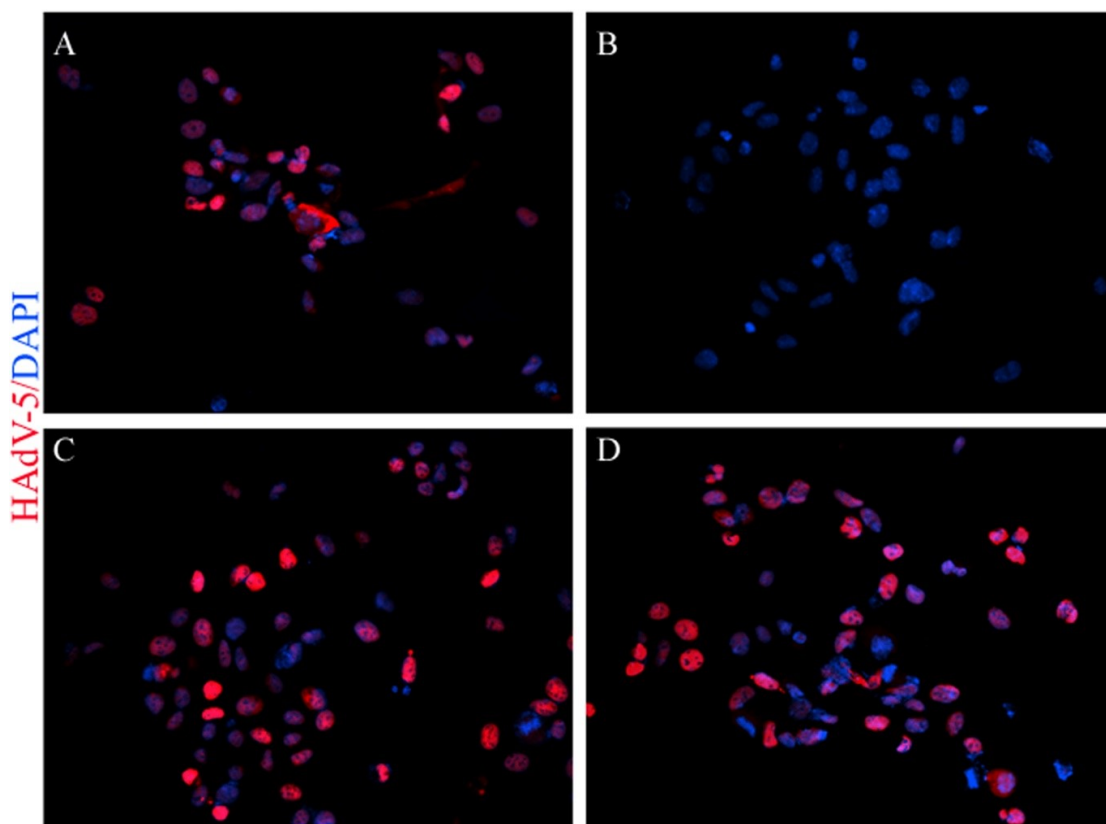
Analizę densytometryczną obrazów WB przeprowadzano z użyciem oprogramowania Image Studio Lite.

3.6. Analiza statystyczna

W analizie ilościowej dokonywano 3 powtórzeń prowadzonych eksperymentów i obliczano wartość średnią z odchyleniem standardowym (SD) dla analizowanych parametrów.

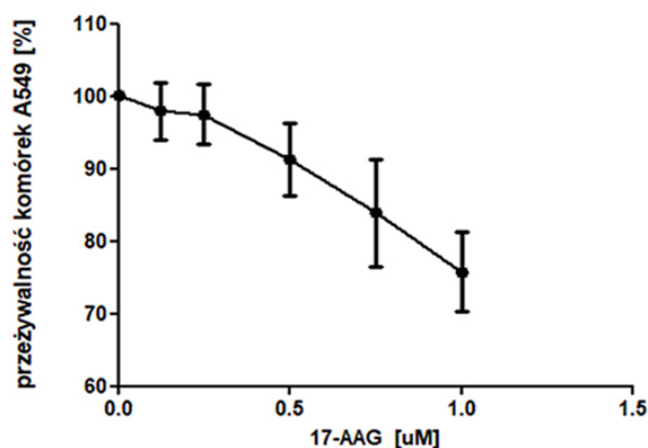
4. WYNIKI

4.1. Wpływ 17-AAG na przejściową inhibicję replikacji HAdV-5



Ryc. 4. Analiza mikroskopowa aktywności przeciwwirusowej 17-AAG. Zakażone HAdV5 komórki A549 hodowane były bez inhibitora (A, C) bądź w obecności 0,25 μ M 17-AAG (B, D). Po 24 (A, B) i 48 godzinach (C, D) hodowle utrwalono i barwiono przeciwciałem poliklonalnym rozpoznającym białka kapsydu HAdV-5 (czerwony). Jądra komórkowe barwiono DAPI (niebieski).

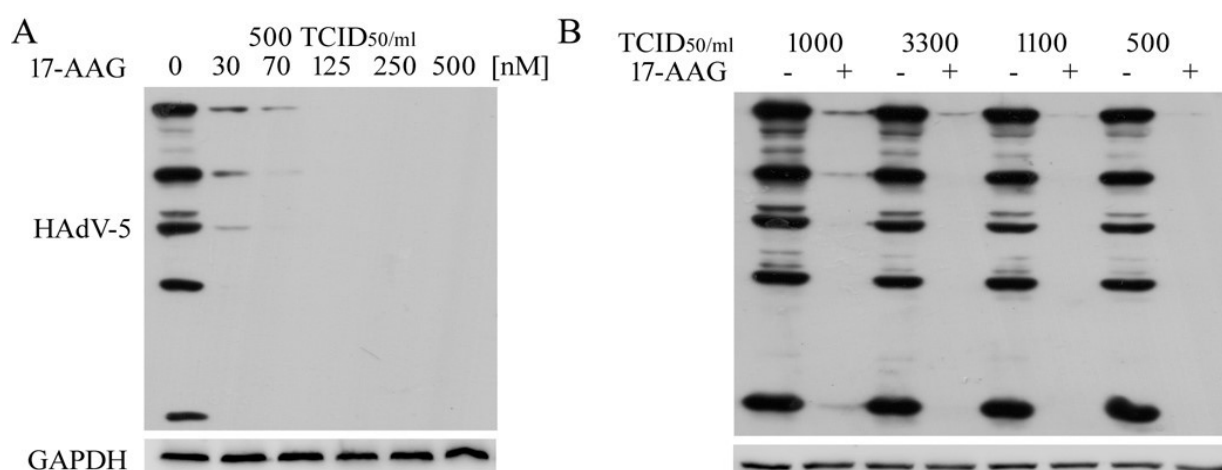
W celu zbadania czy Hsp90 jest konieczne do replikacji AdV5 wykonano barwienie immunfluorescencyjne. Komórki A549 zakażono HAdV-5 o mianie 500 TCID₅₀/ml i hodowano w medium IMDM z dodatkiem 0,25 μ M 17-AAG przez 24 i 48 godzin. Wizualizacji HAdV-5 dokonano przy użyciu przeciwciał poliklonalnych rozpoznających białka struktury HAdV-5 (hexon, penton, białko -IX, -VII, -VI i -V). Jak pokazano na Ryc. 4, w komórkach kontrolnych hodowanych bez dodatku inhibitora wydajność zakażenia HAdV-5 wynosiła ponad 80%. W komórkach A549 hodowanych w obecności 17-AAG po 24 godzinach od momentu infekcji nie wykryto białek wirusa. Efekt inhibicji zanikał po kolejnej dobie hodowli zainfekowanych komórek. W 48 godzinie od zakażenia, mimo dodatku inhibitora, wykryto białka strukturalne HAdV-5.



Ryc. 5. Krzywa przeżywalności wyznaczona dla A549 po 72 godzinach inkubacji w wymienionych stężeniach 17-AAG. Punkty stanowią średnią \pm SD z 3 wykonanych powtórzeń.

Przeprowadzono analizę cytotoksyczności 17-AAG w linii komórkowej A549, aby upewnić się, że obserwowana aktywność przeciwwirusowa nie jest skutkiem śmierci komórek spowodowanej dodatkiem inhibitora. Komórki A549 traktowano kolejnymi rozcieńczeniami 17-AAG w zakresie 0-1 μ M i inkubowano przez 72 godziny. Po tym czasie żywotność hodowli oznaczano przez ilość wytworzonego formazanu za pomocą testu kolorymetrycznego MTT. Na Ryc. 5 pokazano, że w najwyższym zastosowanym stężeniu równym 1 μ M obserwowany jest 25% spadek żywotności komórek w stosunku do kontroli bez inhibitora. W zakresie stężeń 0,125-0,25 μ M po 72 godzinach żywotność A549 utrzymywała się na poziomie ~96%.

4.2. Wpływ stężenia 17-AAG i początkowego inokulum HAdV-5 na inhibicję replikacji



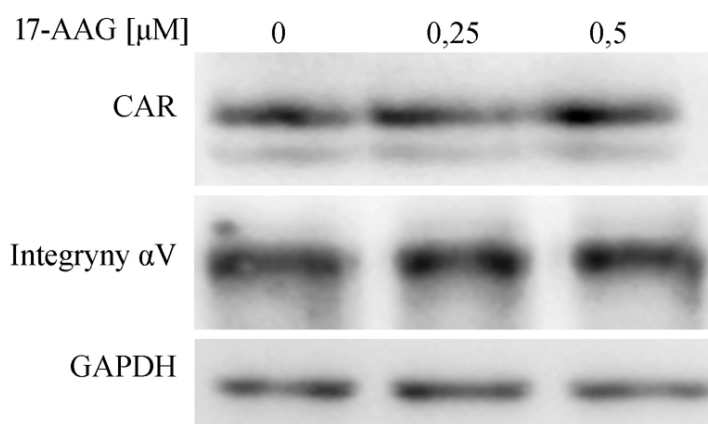
Ryc. 6. Analiza WB komórek A549 A. zakażonych HAdV5 i traktowanych 17-AAG w zakresie stężeń 0,03 – 0,5 μ M oraz B. zakażonych HAdV-5 o różnym mianie, traktowane 0,25 μ M 17-AAG. Do wizualizacji użyto poliklonalne przeciwciała rozpoznające białka struktury HAdV5. Sygnały znormalizowano względem GAPDH. Analizę densytometryczną wykonano z użyciem oprogramowania Image Studio Lite.

Po wyznaczeniu krzywej przeżywalności dla linii komórkowej A549, 17-AAG badano pod kątem aktywności przeciwwirusowej w stężeniach 0,03 – 0,5 μM , w przypadku których wywoływany efekt cytotoksyczny nie przekraczał 20%. Prezentowane wyniki (Ryc. 6A) pokazują inhibicję replikacji HAdV-5 zależną od stosowanego stężenia inhibitora. Przy 0,03 i 0,07 μM 17-AAG obserwowano spadek ilości białek HAdV-5 w stosunku do nietraktowanych komórek kontrolnych. Dla stężeń wyższych obserwowano całkowitą inhibicję produkcji białek struktury wirusa.

Sprawdzono, czy na efekt hamujący 17-AAG ma wpływ początkowe inokulum wirusa. W tym celu zastosowano wysokie miana HAdV-5 do infekcji. Sprawdzono jego aktywność podczas zakażenia hodowli czterema stężeniami wirusa 10 000, 3300, 1100 i 500 TCID₅₀/ml. Analiza ilościowa WB pokazała, że po 24 godzinach hodowli niezależnie od zastosowanego do infekcji początkowego inokulum HAdV-5, 17-AAG w stężeniu 0,25 μM hamuje produkcję białek struktury wirusa (Ryc. 6B).

4.3. Wpływ 17-AAG na proces wiązania HAdV-5 do komórek gospodarza

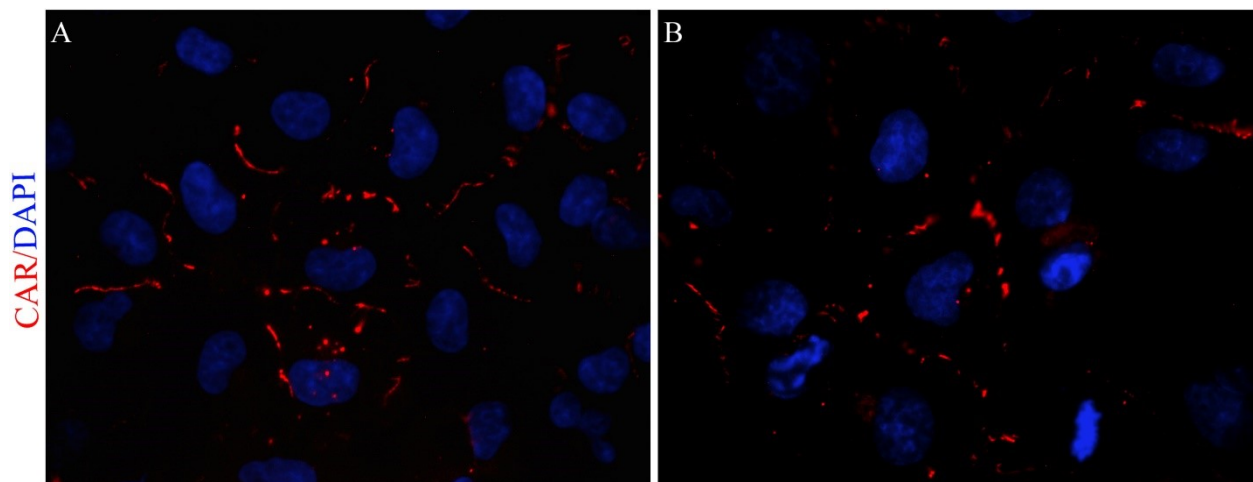
4.3.1. Synteza receptorów CAR i receptorów integrynowych αV



Ryc. 7. Analiza ilościowa WB receptorów CAR i receptorów integrynowych αV . 24-godzinne hodowle A549 traktowane 0,25 i 0,5 μM 17-AAG. Wizualizacji dokonano z użyciem specyficznych przeciwciał rozpoznających omawiane receptory. Sygnały normalizowane względem GAPDH. Analiza densytometryczna wykonano z użyciem oprogramowania Image Studio Lite.

Zbadano, czy zahamowanie propagacji HAdV-5 w obecności 17-AAG związane jest z niewystarczającą ilością dostępnych receptorów CAR, bądź receptorów integrynowych αV na powierzchni błony komórki gospodarza. Analiza densytometryczna pokazała, że mimo zahamowania aktywności Hsp90, w hodowlach nie dochodzi do zmian w poziomie ekspresji omawianych receptorów (Ryc.7).

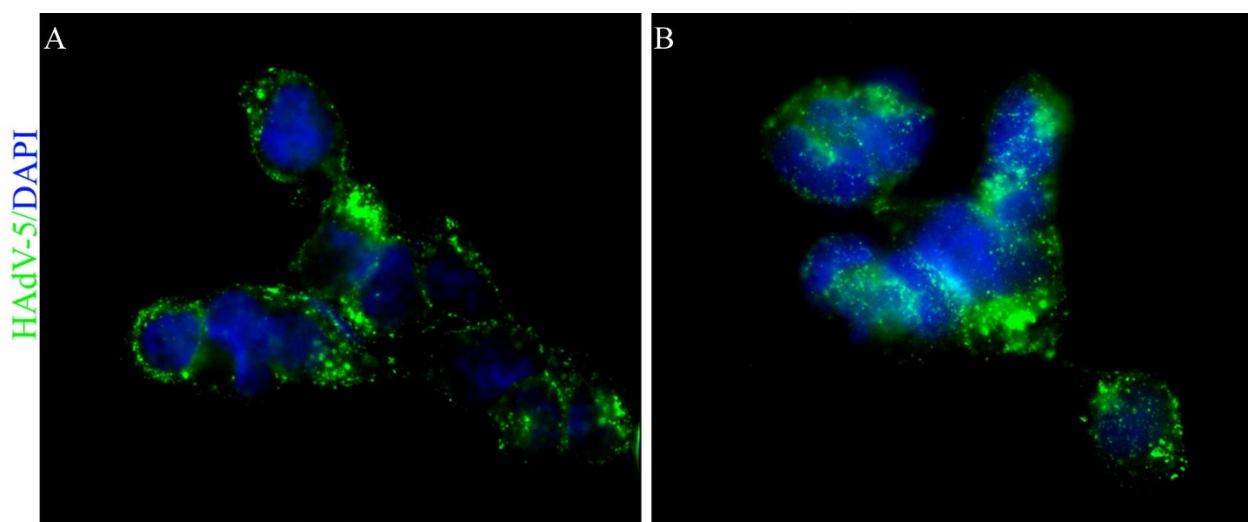
4.3.2. Translokacja receptorów CAR



Ryc. 8. Określenie wpływu 17-AAG na ekspresję receptorów CAR. Zdjęcia mikroskopowe 24-godzinnej hodowli A549 kontrolnej (A) i traktowanej 0,5μM 17-AAG (B). Do barwienia użyto specyficzne przeciwciała α-CAR (czerwony) oraz drugorzędowe przeciwciała związane z fluoroforem. Jądra barwiono DAPI (niebieski).

Przy niezmiennym poziomie ekspresji receptorów I-rzędowych, sprawdzono ich sublokalizację komórkową. Analiza otrzymanych obrazów mikroskopowych nie pokazała różnic w hodowlach kontrolnych i prowadzonych z dodatkiem 17-AAG (Ryc.8). Wyniki pokazały, że zahamowanie aktywności Hsp90 nie wpływa na prawidłową translokację receptorów, ponieważ mimo obecności inhibitora, receptory wykrywane były w obrębie błony komórkowej.

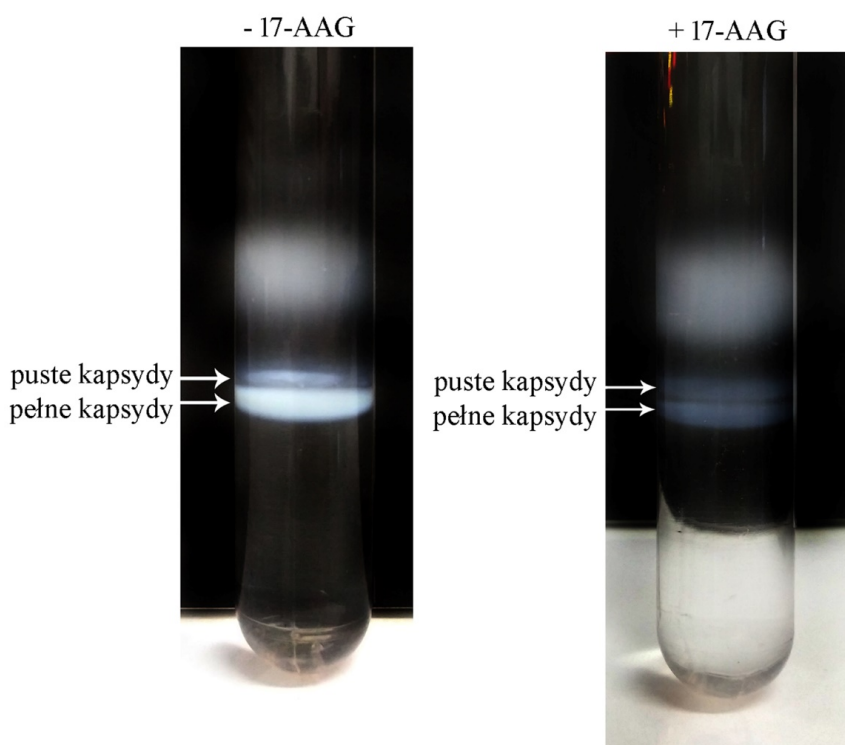
4.3.3. Adsorpcja HAdV-5 do powierzchni komórki gospodarza



Ryc. 9. Określenie wpływu 17-AAG adsorpcję HAdV-5. Zdjęcia mikroskopowe zakażonych komórek A549, utrwalonych w 15 minut od wprowadzenia wirusa do hodowli. Komórki hodowane były w medium hodowlanym bez inhibitora (A) bądź z dodatkiem 0,5 μM 17-AAG (B). Do barwienia użyto poliklonalne przeciwciała rozpoznające białka struktury HAdV-5 (zielony) oraz drugorzędowe przeciwciała związane z fluoroforem – Alexa Fluor 488. Jądra barwiono DAPI (niebieski).

Sprawdzono, czy dodatek 17-AAG wpływa na skuteczny proces wiązania białka fiber wirusa do powierzchniowych receptorów CAR. Obrazy mikroskopowe pokazały w 15 minucie od zakażenia wydajną adsorpcję wirusa mimo obecności zahamowania aktywności Hsp90. HAdV-5 zarówno w komórkach kontrolnych jak i traktowanych 17-AAG lokalizował się w obrębie błony komórkowej (Ryc.9). Oznacza to, że mimo stosowania inhibitora Hsp90, tworzone są funkcjonalne struktury receptorów, przez co możliwe jest związanie wirusa i inicjacja infekcji.

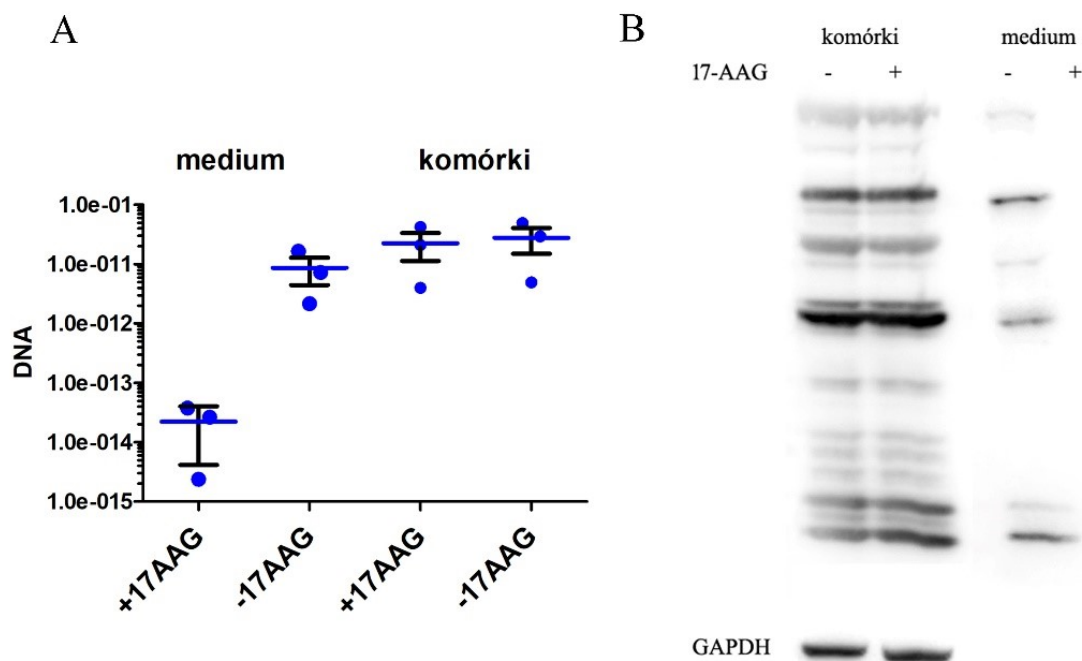
4.4. Wpływ 17-AAG na produkcję wirionów potomnych HAdV-5



Ryc. 10. Określenie stosunku złożonych i pustych kapsydów HAdV-5. Zakażone komórki A549 hodowano przez 48 godzin w medium pozbawionym inhibitora bądź z 0,5 μM 17-AAG. Pozyskany materiał poddawano ultrawirowaniu w gradiencie CsCl. Prażki o większej ciężkości reprezentują pełne kapsydy, natomiast lżejsze – puste kapsydy.

Wydajność produkcji wirionów potomnych przy zahamowaniu Hsp90 sprawdzono przez ultrawirowanie w gradiencie CsCl, które pozwala na rozdział frakcji wirusów zawierających DNA i pustych kapsydów. W tym celu komórki A549 zakażono wirusem i hodowano z 0,5 μM 17-AAG bądź bez inhibitora. Po 48 godzinach hodowle zakończono i metodą zamrażania-rozmrażania z komórek uwolniono HAdV-5. Uzyskany nadsącz następnie poddano ultrawirowaniu w gradiencie CsCl. Jak pokazano na Ryc.10, w obecności inhibitora obserwowano zmniejszoną ilość białek HAdV-5, jak również równy stosunek pustych i pełnych kapsydów. W hodowlach kontrolnych, widoczna jest dominująca frakcja o większej ciężkości, reprezentująca kompletne cząstki infekcyjne.

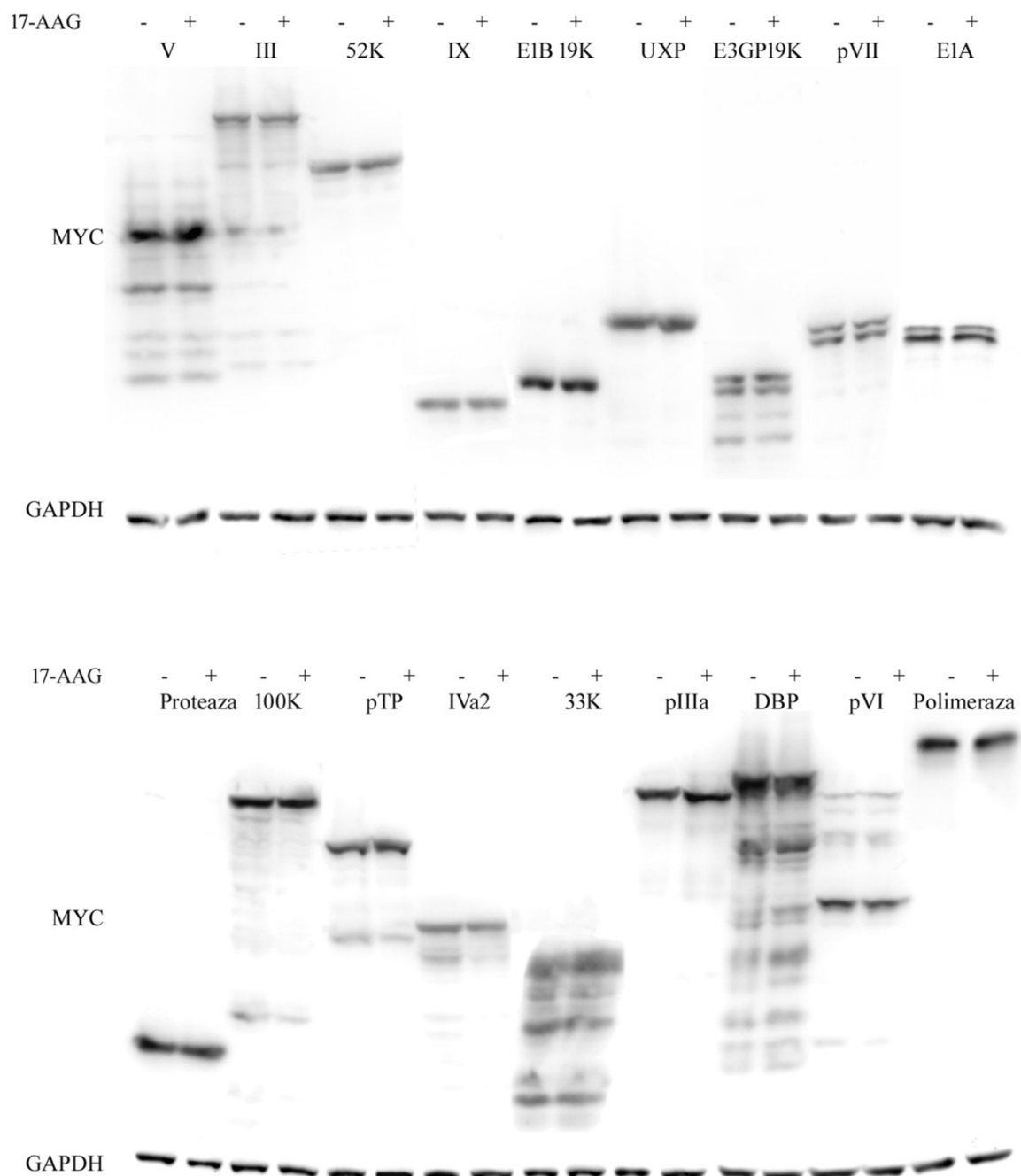
4.5. Wpływ 17-AAG na replikację HAdV-5 w komórkach oraz na sekrecję wirionów potomnych do medium



Ryc. 11. Porównanie ilości DNA (A) i białek struktury (B) HAdV-5 wyizolowanego z medium i z komórek. Komórki A549 zostały zakażone i następnie hodowane 48 godzin w obecności 0,5 μ M 17-AAG bądź bez inhibitora. Ilość DNA mierzono w ilościowej reakcji Real-time PCR, zaś białka wirusa mierzono metodą WB. Materiał do analizy pobrano z medium i komórek oddzielnie. Do reakcji PCR użyto primerów specyficznych dla genu hexon. Do analizy WB użyto przeciwciała poliklonalnego rozpoznającego białka struktury HAdV-5.

Na uprzednio pokazanych wynikach, materiał analizowany przez ultrawierowanie w gradiencie CsCl pozyskiwano z medium i komórek jednocześnie. Podejście, w którym DNA HAdV-5 izolowane jest oddzielnie z komórek i nadsączu pozwala na dokładne wskazanie, czy deficyt pełnych kapsydów jest wynikiem zahamowania procesu replikacji DNA, czy też nieskutecznego pakowania i uwalniania wirionów potomnych z komórki gospodarza. Analiza ilościowa PCR wykazała, że mimo zahamowania aktywności Hsp90, ilość DNA HAdV-5 w komórkach kontrolnych i traktowanych 17-AAG jest taka sama (Ryc.11A). Ilość materiału genetycznego wyizolowanego z medium z dodatkiem inhibitora, zmalała o 3 rzędy wielkości w stosunku do kontroli nietraktowanej inhibitorem. Wyniki Real-time PCR pokrywają się z danymi uzyskanymi z obrazów WB, na których ekspresja białek HAdV-5 w obecności 17-AAG jest taka sama jak w hodowlach kontrolnych (Ryc.11B). Efekt ten nie jest obserwowany dla prób uzyskanych z medium. W tym przypadku, mimo wydłużonego czasu hodowli, po 48 godzinach, nie dochodzi do zwiększenia ilości białek wirusa.

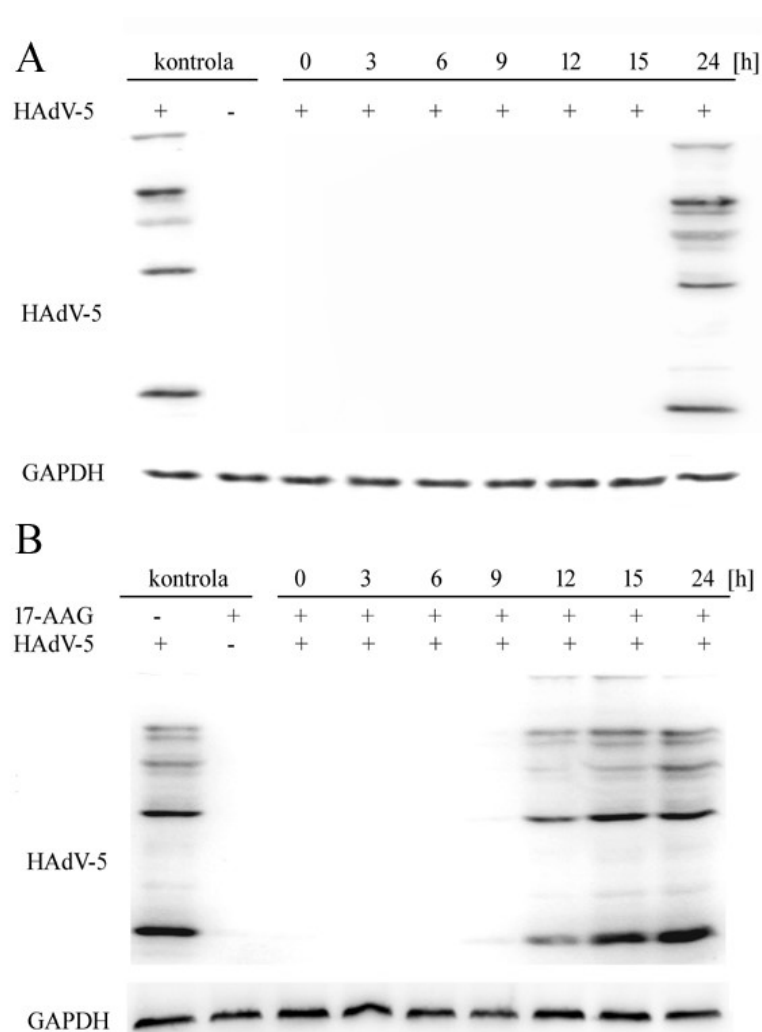
4.6. Wpływ 17-AAG na przejściową ekspresję sklonowanych białek HAdV-5



Ryc. 12. Analiza WB wpływu 17-AAG na poziom ekspresji białek HAdV-5. Komórki HEK293 transfekowane były plazmidami kodującymi poszczególne białka wirusa. Po 4 godzinach mieszanina transfekcyjna została usunięta i zastąpiona medium hodowlanym wzbogaconym 0,5 μ M 17-AAG. Po 24 godzinach hodowle zakończono i pozyskane próbki białka analizowano z użyciem przeciwciała rozpoznającego znacznik Myc. Sygnały normalizowano względem GAPDH.

Zmniejszona ilość pełnych kapsydów, w połączeniu z wynikami wskazującymi na spadek ilości DNA HAdV-5 w medium z dodatkiem 17-AAG wskazuje, że Hsp90 może brać udział w dojrzewaniu białek wirusa uczestniczących w pakowaniu DNA do kapsydu, bądź uczestniczących w uwalnianiu wirionów potomnych z komórek gospodarza. Dlatego też sprawdzono jak zahamowanie aktywności Hsp90 wpłynie na produkcję białek HAdV-5, biorących udział zarówno w składaniu infekcyjnych cząstek jak również uwalniania wirusów potomnych. Obrazy WB uzyskane z transfekowanych plazmidami komórek pokazały, że dodatek 17-AAG nie wpływa na poziom ekspresji żadnego z badanych białek wirusa (Ryc.12). Białka hexon, fiber i penton nie ulegają ekspresji w przedstawionym modelu.

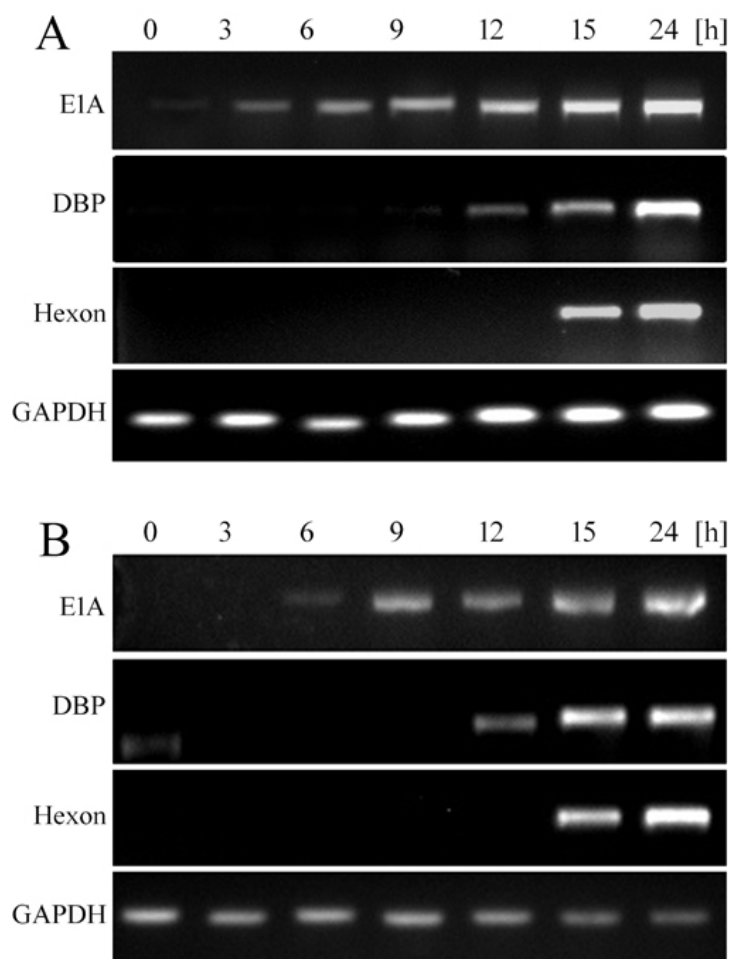
4.7. Wpływ 17-AAG na ekspresję białek struktury HAdV-5



Ryc. 13. Analiza WB komórek A549 zakażonych HAdV-5. A. Hodowle komórek A549 zakażono, następnie lizowano w poszczególnych punktach czasowych. B. Do zakażonych komórek A549, 0,25 μ M 17-AAG dodawany był we wskazanych punktach czasowych. Po 24 godzinach od zakażenia hodowle zakończono i analizowano ilościowo z użyciem poliklonalnego przeciwciała rozpoznające białka struktury HAdV-5. Sygnały normalizowano względem GAPDH. Kontrolę ujemną stanowiły komórki A549 bez wirusa, zaś dodatnią zakażone hodowle bez 17-AAG.

Przeprowadzono eksperyment, w którym określono moment w przebiegu infekcji, w którym następuje synteza białek struktury HAdV-5. Wyniki WB wykazały, że białka te pojawiają się w między 15 a 24-godziną od wprowadzenia wirusa do hodowli. Następnie sprawdzono czy obecność 17-AAG hamuje replikację HAdV-5 na wczesnym czy też późnym etapie cyklu życiowego. Analiza otrzymanych obrazów WB pokazała, że 17-AAG wywołało silne działanie hamujące po dodaniu do zakażonych hodowli (Ryc.13A). Inhibicja produkcji białek struktury HAdV-5 obserwowana była do 9 godziny od zakażenia. W późniejszych punktach czasowych aktywność przeciwwirusowa 17-AAG stopniowo malała, ponieważ ilość białek HAdV-5 zbliżona była do kontroli nietraktowanej inhibitorem (Ryc. 13B).

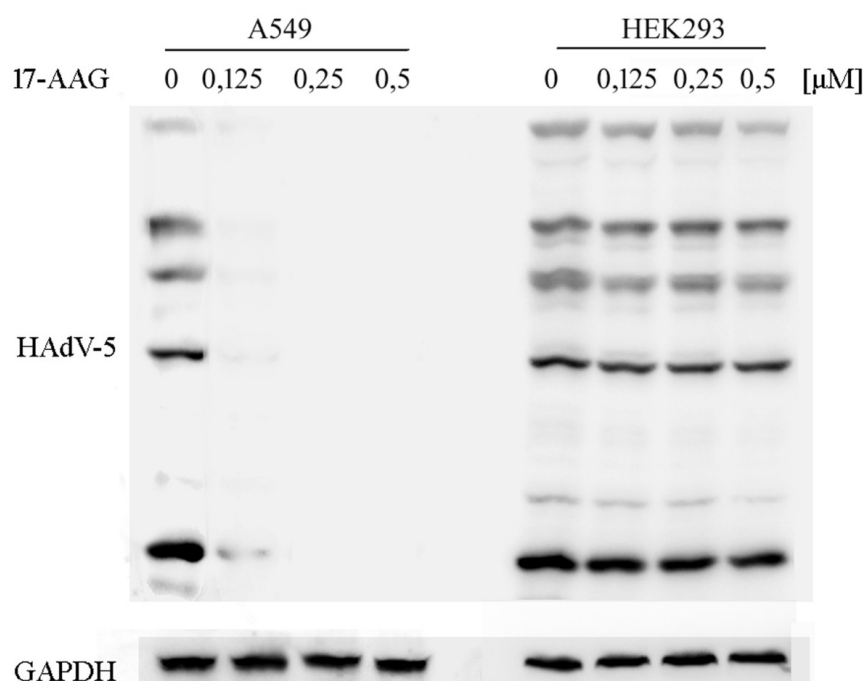
4.8. Wpływ 17-AAG na transkrypcję genów HAdV-5



Ryc. 14. Analiza ilościowych zmian RNA genów wczesnych, pośrednich i późnych HAdV-5 A. Komórki A549 zakażono HAdV-5, a następnie w poszczególnych punktach czasowych izolowano całkowite RNA. B. Hodowle A549 zakażono a następnie 0,25 μ M 17-AAG dodawano we wskazanych punktach czasowych. Po 24 godzinach hodowle zakończono i wyizolowano całkowite RNA, a cDNA do półilościowej reakcji PCR otrzymano w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji. Do reakcji użyto primery specyficzne do poszczególnych genów wczesnych, pośrednich i późnych. Sygnały normalizowano względem GAPDH.

Następnie, z użyciem półilościowej metody PCR, określono moment w przebiegu infekcji, w którym powstają transkrypty badanych genów. Dla genu wczesnego E1A, transkrypt obecny był już w 3 godzinie od zakażenia. mRNA DBP i hexon pojawiło się odpowiednio w 12 i 15 godzinie. W celu oceny, czy obserwowany powyżej spadek ilości białek HAdV-5 jest wynikiem zahamowania ich syntezy, czy też wynikiem zakłóconej transkrypcji genów przekładającej się na obniżoną ilość mRNA, przeprowadzono eksperyment, w którym do zakażonych hodowli dodawano inhibitor w wyszczególnionych punktach czasowych. Prezentowane wyniki pokazują, że dodatek 17-AAG powoduje spadek ilości mRNA każdego z badanych genów (Ryc. 14A). 17-AAG skutecznie hamuje transkrypcję E1A w momencie kiedy dodawany jest do zakażonej hodowli w pierwszych punktach czasowych- w momencie zakażenia i 3 godziny później. W 6 godzinie obserwowano osłabiony efekt inhibicji 17-AAG, ponieważ w komórkach jest już większa ilość mRNA tego genu. Inhibicja transkrypcji dla DBP i hexonu następowała, kiedy inhibitor dodawany był odpowiednio do 9 i 12 godziny (Ryc. 14B).

4.9. Rekompensacja inhibicji replikacji HAdV-5 przez endogenne E1A

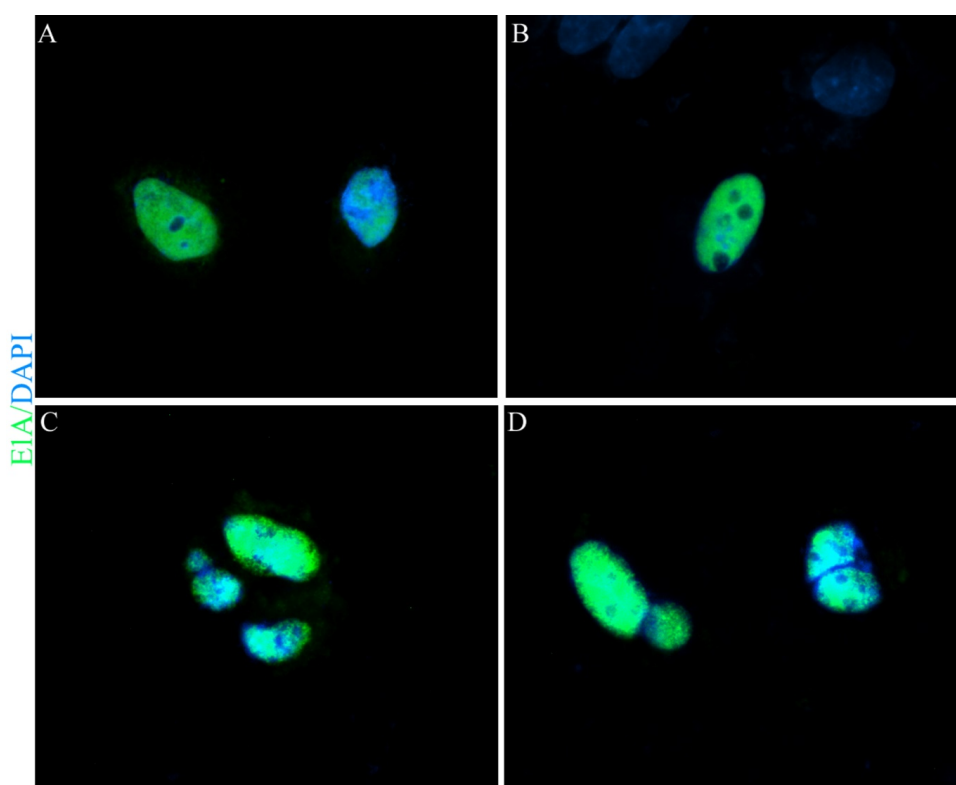


Ryc. 15. Analiza wpływu endogennego białka E1A na replikację HAdV-5. Komórki A549 i HEK293 hodowane były w 0,125, 0,25 i 0,5μM 17-AAG. Po 24 godzinach hodowle zakończono i analizowano metodą WB z użyciem poliklonalnego przeciwciała rozpoznającego białka kapsydu HAdV-5. Sygnały normalizowano względem GAPDH.

W celu potwierdzenia znaczenia aktywności Hsp90 w przebiegu infekcji i jego interakcji z białkiem E1A, porównano efekt 17-AAG na komórki A549 i HEK293. HEK293

jest linią komórkową nieśmiertelnioną przez transfekcję DNA HAdV-5 i produkuje konstytutywnie białko E1A, w przeciwieństwie do komórek A549. Pozwoliło to na sprawdzenie czy endogenne białko pochodzenia komórkowego wpływa na replikację HAdV-5 mimo równoczesnego stosowania inhibitora 17-AAG. Obrazy WB ilustrują, że wydajność namnażania wirusa w kontrolach obu linii jest taka sama, zaś przy inhibicji aktywności Hsp90 skutkującej zmniejszeniem ilości białka E1A, replikacja w hodowli A549 zostaje w pełni zahamowana. Efektu tego nie obserwowano w linii komórkowej HEK293 (Ryc. 15).

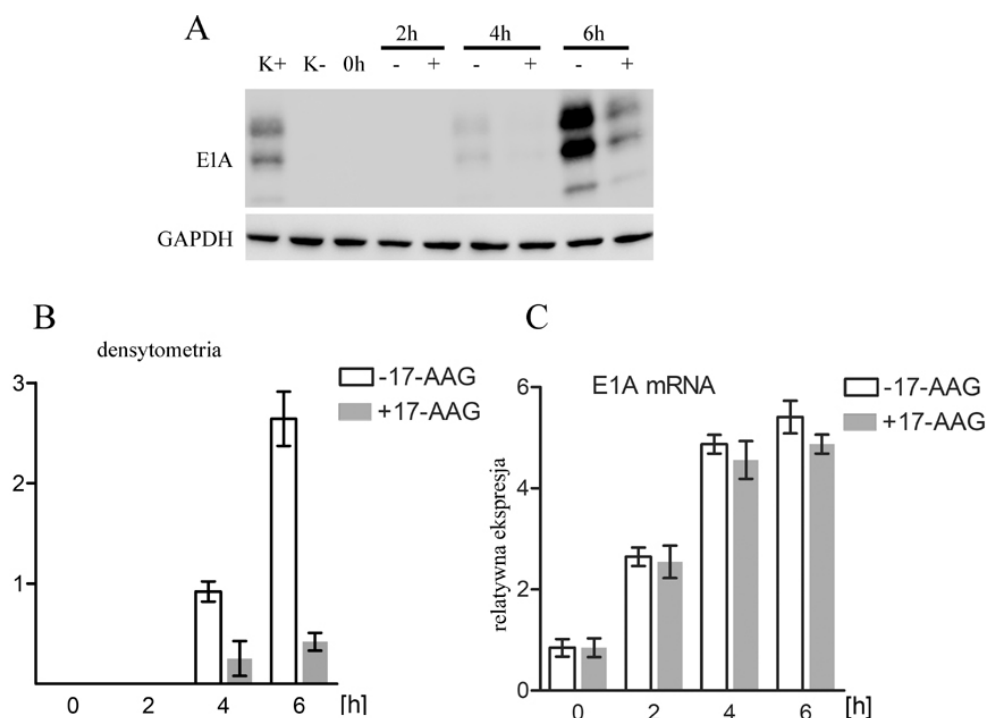
4.10. Wpływ 17-AAG na sublokalizację komórkową E1A w liniach komórkowych A549 i HEK293



Ryc. 16. Określenie wpływu 17-AAG na lokalizację białka E1A. Zdjęcia mikroskopowe komórek A549 (A, B) oraz HEK293 (C, D) transfekowanych plazmidem kodującym E1A-289R-Myc komórek A549. Obie linie hodowano bez inhibitora (A, C) bądź z 0,5 μM 17-AAG. (B, D). Następnie komórki utrwalono po 24 godzinach hodowli i barwiono przeciwciałem specyficznym wobec E1A (zielony) oraz drugorzędowym przeciwciałem związanym z fluoroforem – Alexa Fluor488. Jądra barwiono DAPI (niebieski).

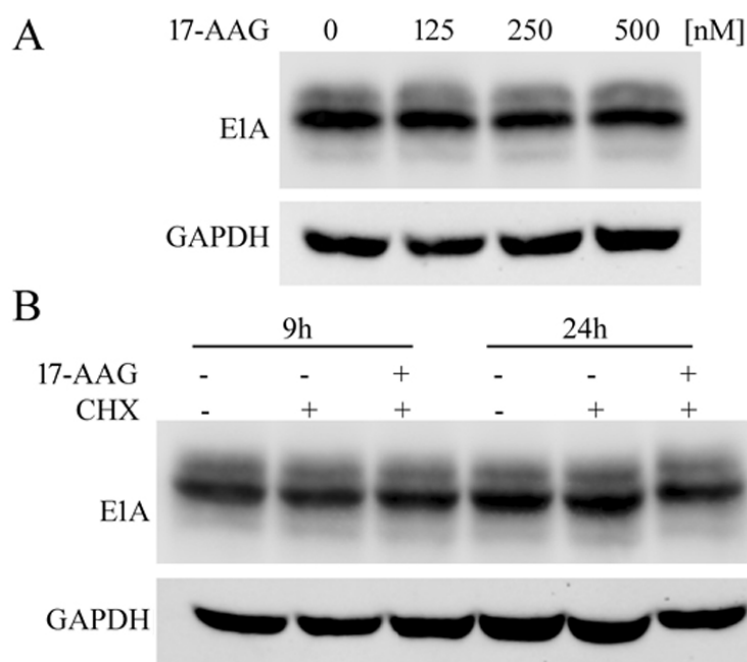
Sprawdzono, czy zahamowanie Hsp90 zapobiega transportowi białka E1A do jądra w komórkach A549 i HEK293. Zbadano lokalizację subkomórkową E1A w hodowlach prowadzonych z 0,5 μM 17-AAG, jak i bez inhibitora. Obrazy mikroskopowe pokazały, że niezależnie od traktowania hodowli, w obu liniach E1A preferencyjnie lokalizuje się w jądrze komórki gospodarza (Ryc. 16). Oznacza to, że zahamowanie aktywności Hsp90 nie wpływa na prawidłową lokalizację białka wczesnego.

4.11. Wpływ 17-AAG na ekspresję białka wczesnego E1A i jego mRNA



Ryc. 17. Analiza ilościowa WB wpływu 17-AAG na ekspresję wirusowego białka E1A. Komórki A549 zakażono HAdV-5 o $TCID_{50}$ 5×10^5 /ml i hodowano przez 2, 4 i 6 godzin w 4 μ M 17-AAG. Hodowle zakończono w wymienionych punktach czasowych i analizowano z użyciem specyficznego przeciwciała α -E1A. Sygnały normalizowano względem GAPDH. B. Analiza densytometryczna obrazu uzyskanego dla ekspresji białka E1A przeprowadzona z użyciem oprogramowania Image Studio Lite. C. Porównanie zmian ilościowych RNA kodującego białko E1A. Komórki traktowano jak opisano wcześniej. Całkowite RNA wyizolowano i poddano reakcji Real-time PCR z użyciem primerów specyficznych wobec E1A. Normalizowano względem Ct uzyskanego dla GAPDH. Wykresy B i C zawierają średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów.

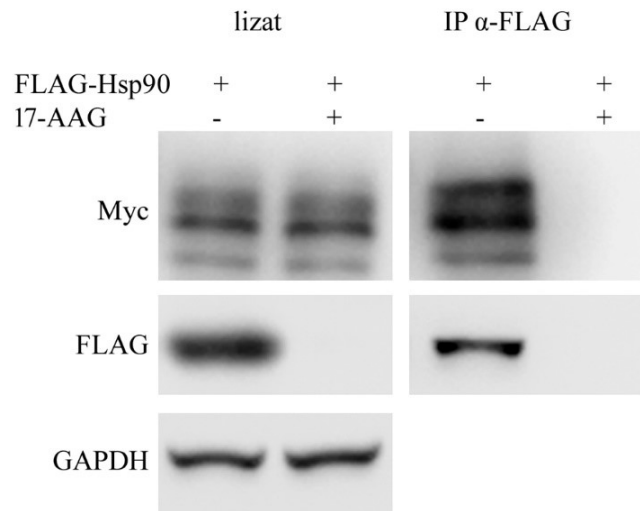
Sprawdzono, czy dodatek 17-AAG wpływa na ilość białka wczesnego. Analiza WB pokazała, że nowo syntetyzowane białko E1A widoczne jest w hodowlach kontrolnych od 4 godziny od zakażenia (Ryc. 17A). Analiza densytometryczna pokazała, spadek ilości białka E1A 3,6-krotnie i 6,3-krotnie odpowiednio dla 4 i 6 godziny (Ryc. 17B). Zahamowanie Hsp90 przez dodatek 17-AAG nie spowodowało obniżenia poziomu mRNA, które odpowiadałoby obserwowanemu spadkowi ilości białka E1A, w żadnym z analizowanych punktów czasowych. Relatywna ekspresja mRNA E1A, wyznaczona podczas ilościowej reakcji Real-time PCR pokazała, że dodatek inhibitora nie wpłynął na wydajność procesu transkrypcji. RNA E1A było wykrywalne w komórce gospodarza już 2 godziny po infekcji i jego poziom stopniowo wzrastał wraz z wydłużającym się czasem hodowli (Ryc. 17C). Wykazano tym samym, że obserwowana w obecności 17-AAG zmniejszona ilość białka E1A nie jest powodowana przez spadek transkrypcji.

4.12. Wpływa 17-AAG na syntezę *de novo* E1A

Ryc. 18. Analiza ilościowa WB wpływu 17-AAG na ekspresję endogennego białka E1A. A. Komórki HEK293 traktowano stężeniami 17-AAG w zakresie 125-500 nM bądź B. 0,5 μ M 17-AAG oraz kombinacją 0,5 μ M 17-AAG z 100 μ g/ml CHX przez 9 i 24 godziny. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w medium bez inhibitora. Po 24 godzinach hodowle zakończono i analizowano z użyciem przeciwciała specyficznego dla E1A. Sygnały normalizowano względem GAPDH.

Sprawdzono, czy uprzednio pokazany spadek ilości białka E1A przy jednoczesnej niezmięnionej ilości kodującego go mRNA jest skutkiem przyspieszonej degradacji, czy też zahamowania jego translacji. Analiza ilościowa WB pokazała, że niezależnie od zastosowanego stężenia inhibitora Hsp90, poziom E1A utrzymuje się na stałym poziomie (Ryc. 18A). Wyklucza to zatem możliwość ukierunkowania białka na ścieżkę degradacji przy jednoczesnym zahamowaniu aktywności Hsp90. CHX użyty został do dalszego wykluczenia procesu degradacji białka E1A jako przyczyny zahamowania procesu replikacji HAdV-5 i tym samym wskazania translacji jako procesu zależnego od aktywności Hsp90. Zastosowany w tym układzie CHX hamował syntezę *de novo* białka E1A, umożliwiając tym samym obserwację potencjalnych zmian w ilości obecnego już w komórkach, natywnego białka wczesnego. Analiza WB pokazała, że zarówno w komórkach z 17-AAG, jak również z kombinacją 17-AAG i CHX, poziom E1A pozostaje niezmienny (Ryc. 18B).

4.13. Koimmunoprecypitacja Hsp90 α E46A z E1A 289R



Ryc. 19. Analiza WB immunoprecypitatów i lizatów. Komórki HEK293 kotransfekowano plazmidem zawierającym sekwencję kodującą E1A 289R-Myc i plazmidem kodującym mutantem E46A Hsp90 α -Flag. Do immunoprecypitacji zastosowano przeciwciało specyficzne dla metki FLAG. Ekstrakty komórkowe (lizat) i białka związane z przeciwciałem anti-Flag (IP α -Flag) analizowano z użyciem przeciwciał anti-Flag lub anti-Myc w celu wykrycia odpowiednio Hsp90 α i E1A 289R.

Aby zbadać, czy E1A należy do klientów Hsp90, przeprowadzono koimmunoprecypitację tego białka z mutantem E46 Hsp90 α . Mutacja E46A w Hsp90 powoduje, że ATP jest wiązane, ale nie hydrolizowane. To powoduje stabilizację kompleksów ze związanymi klientami i pozwala na ich izolację. Komórki HEK293 transfekowano plazmidem kodującym mutantem białka Hsp90 α z doczepioną metką FLAG, jak również plazmidem kodującym E1A 289R z metką Myc. Wyniki koimmunoprecypitacji z użyciem przeciwciała specyficznego dla peptydu FLAG pokazują, że Hsp90 oddziałuje z białkiem E1A 289R (Ryc. 19).

5. DYSKUSJA

Kiedy po raz pierwszy wskazano rolę Hsp90 w ochronie komórek przed stresem środowiskowym, w tym stresem termicznym, założono że będzie pełniło również funkcję zapobiegania infekcjom wirusowym. Badania nad Hsp90 z czasem wykazały, że pierwotna teza jest błędna, a postępujące badania nad omawianym białkiem jedynie potwierdzały zależność wydajnego procesu replikacji wirusów a aktywnością Hsp90 [121-122]. Pierwsze doniesienia o aktywności opiekuńczej wobec białek wirusowych pojawiły się w 1981 roku, podczas prac Opperman H. i in., w których dowiedziono że Hsp90 wiąże się z fosfoproteiną syncytialnego wirusa oddechowego [123]. Obserwowana zależność wydaje się być uniwersalna dla wirusów ze wszystkich grup, ale Hsp90 pełni różne funkcje w przypadku różnych wirusów. W niniejszej pracy podjęto próbę wykazania, że proces propagacji HAdV-5 jest zależny od aktywności Hsp90. Następnie, skupiono się na identyfikacji konkretnego etapu replikacji, który zakłócony jest przez dodatek specyficznego inhibitora Hsp90 – 17-AAG. Poprzez klonowanie genów HAdV-5, sprawdzono oddziaływanie poszczególnych białek wirusa z białkiem opiekuńczym.

5.1. Ocena wpływu 17-AAG na proces replikacji HAdV-5

Geldanamycyna (GA) jest swoistym inhibitorem Hsp90, który wiąże się w miejscu przyłączania ATP w obrębie domeny N-końcowej i hamuje aktywność opiekuńczą wobec białek-klientów. GA był używany w badaniach nad udziałem Hsp90 w infekcji wirusów z różnych grup i wykazywał aktywność przeciwwirusową wobec badanych patogenów. Aby potwierdzić czy omawiane białko opiekuńcze bierze udział w replikacji HAdV-5, w badaniach zastosowano mniej toksyczną i bardziej stabilną pochodną GA – 17-AAG. W niniejszej pracy wykazano, że inhibitor stosowany w stężeniach nietoksycznych dla komórek powoduje zahamowanie replikacji badanego wirusa. Otrzymane obrazy mikroskopowe wskazują, że zastosowanie inhibitora w stężeniu 0,5 μM , powoduje całkowite zahamowanie produkcji białek struktury HAdV-5 w pierwszych 24 godzinach od infekcji. Po 48 godzinach, efekt zahamowania zanika. Przez analizę obrazów WB dowiedziono, że obserwowany efekt inhibicji zależny jest od stosowanej dawki 17-AAG. Dla zakresu stężeń 125-500 nM 17-AAG widoczne było całkowite zahamowanie replikacji, zaś przy dwóch zastosowanych stężeniach - 30 i 70 nM efekt inhibicji był słabszy, jednak nadal widoczne było znaczne zmniejszenie ekspresji białek struktury HAdV-5 w stosunku do zakażonych komórek kontrolnych. Oznacza to, że proces replikacji HAdV-5 wrażliwy jest na zahamowanie aktywności Hsp90, a aktywność przeciwwirusowa 17-AAG obserwowana jest już przy niskich stężeniach

stosowanego inhibitora. Wykazano również, że wysokie inokulum zastosowane do zakażenia komórek A549, nie zmniejsza efektu inhibicji.

5.2. Ocena aktywności Hsp90 w procesie dojrzewania receptorów i adsorpcji

HAdV-5 do komórki gospodarza

Dane literaturowe wskazują, że Hsp90 uniemożliwia wejście części wirusów do komórek gospodarza [107]. Stąd w niniejszej pracy doktorskiej sprawdzono, jak 17-AAG wpływa na pierwszo- i drugorzędowe receptory wymagane do inicjacji infekcji HAdV-5. Badania przeprowadzone przez Chai K. i in., wykazały że inhibicja Hsp90 w linii komórkowej międzybłoniaka opłucnej o zwiększonej rakotwórczości JMB1, zwiększała ekspresję receptorów CAR i integrynowych $\alpha V\beta 3$, jednak w nieznacznym stopniu powodowała spadek ilości receptorów $\alpha V\beta 5$ [124]. Wyniki przedstawione w rozprawie pokazują, że zastosowanie 17-AAG w linii A549 nie wpływa na liczbę receptorów CAR i całkowitą ilość receptorów integrynowych αV . Oznacza to, że obserwowane zahamowanie replikacji HAdV-5 nie jest spowodowane zmniejszoną ilością i stabilnością receptorów koniecznych do związania i wniknięcia wirusa do komórki gospodarza. Różnice między pracą zespołu Chai K. i in., a przedstawionymi wynikami w pracy doktorskiej mogą wynikać z dużej heterogenności grupy receptorów integrynowych, zarówno w obrębie jednej linii nowotworowej, jak również między różnymi modelami *in vitro* [125]. Niemniej jednak, w żadnym z badanych receptorów, przy jednoczesnej inhibicji Hsp90, nie jest obserwowane całkowite zahamowanie ekspresji mogące być skutkiem degradacji białek. Stąd wniosek, że omawiane receptory nie należą do puli klientów tego białka opiekuńczego.

Hsp90 przy współdziałaniu z Hsp70 i białkami pomocniczymi uczestniczy w mechanizmach translokacji klientów, w tym wielu receptorów, do których zaliczyć można receptor glukokortykoidowy, receptor dioksyn, receptor kinazy tyrozynowej ErbB2, receptor naskórkowego czynnika wzrostu, kanał chlorkowy CFTR i białko $G\alpha$. Badania pracy doktorskiej wykazały, że zahamowanie aktywności Hsp90 przez dodatek 17-AAG nie wpływa na lokalizację pierwszorzędowych receptorów CAR. CAR preferencyjnie lokalizuje się w obrębie błony komórkowej, gdzie przez zewnętrzną domenę N-kończącą następuje związanie białka fiber HAdV-5. Otrzymane obrazy mikroskopowe pokazały, że dodatek 17-AAG nie wpływa na translokację receptorów, ponieważ przy zahamowaniu aktywności Hsp90, receptory nadal obserwowane były na powierzchni błony komórkowej. Dodatkowo w badanych komórkach A549, receptory CAR tworzyły struktury nieciągłe na powierzchni

blony. Jest to zgodne z wcześniej uzyskanymi danymi, które wskazują na punktowe bądź przerywane pokrycie komórek [126]. Dodatkowym wykluczeniem etapu adsorpcji wirusa, jako procesu zależnego od Hsp90 było wykonanie barwienia immunofluorescencyjnego traktowanych 17-AAG komórek A549 po 15 minutach od zakażenia. Wybrany punkt czasowy, w którym komórki A549 były utrwalone, wynikają z danych literaturowych, które wskazują na dużą liczebność receptorów CAR na powierzchni błony komórek wywodzących się z gruczołakoraków układu oddechowego oraz na wysokie powinowactwo białka fiber HAdV-5 do omawianych receptorów. Krótki czas inkubacji miał za zadanie również ograniczyć obserwowany efekt jedynie do związania wirusa do powierzchni komórek, a nie jego internalizacji [127-128]. Otrzymane wyniki pokazują, że niezależnie od aktywności Hsp90, adsorpcja wirusa do powierzchni komórki gospodarza pozostała niezakłócona.

5.3. Ocena aktywności Hsp90 na poszczególnych etapach replikacji HAdV-5

Dalsza analiza mająca na celu identyfikację konkretnego etapu replikacji HAdV-5 zależnego od Hsp90 wymagała określenia dynamiki procesu namnażania. W tym celu przeprowadzono eksperymenty, w których w odpowiednich punktach czasowych po infekcji, zakażone hodowle poddawano analizie i określano zawartość białek HAdV-5, jego mRNA, i DNA. Analiza WB ilości białek wirusa w poszczególnych czasach wykazała, że białka struktury są wykrywane w 24 godzinie od zakażenia. Analiza ekspresji mRNA wybranych genów reprezentujących odpowiednie etapy cyklu życiowego HAdV-5 została przeprowadzona podczas reakcji półilościowej PCR i wskazała czas powstawania poszczególnych transkryptów. Z uzyskanych danych wynika, że mRNA E1A pojawia się w pierwszych punktach czasowych co pokrywa się z danymi o kinetyce ekspresji E1A, ponieważ ulega ono transkrypcji w komórce gospodarza krótko po wniknięciu HAdV-5 do jądra. Następnie, dane uzyskane dla transkryptu pośredniego – DBP, wskazują, że obecny jest w zakażonych hodowlach w 12 godzinie od infekcji. Dla hexonu, mRNA wrywane było w 15 godzinie od zakażenia. Zgodnie z wynikami uzyskanymi przez Crisostomo L. i in., po infekcji HAdV-5, RNA DBP wykrywane było w 9 godzinie od wprowadzenia wirusa do hodowli, zaś RNA hexonu w 11 godzinie. Rozbieżności w czasie wykrywania poszczególnych transkryptów HAdV5, mogą wynikać z różnic w tempie ich ekspresji w różnych modelach *in vitro*. Wykazano, że dla linii HeLa, czas po jakim obserwowano ekspresję badanego mRNA E1A i E3 był odpowiednio 3- i 4- krotnie krótszy niż dla wywodzącej się z fibroblastów płuc linii komórkowej IMR-90 [129]. W pracy doktorskiej

dowodzono, że powstawanie mRNA E1A, DBP i hexonu w zakażonej linii A549 jest zgodne z kolejnością ekspresji genów wczesnych, pośrednich i późnych. Uzyskane wyniki zostały potwierdzone badaniami przeprowadzonymi przez zespół prof. Macieja Przybylskiego w Zakładzie Mikrobiologii Klinicznej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Dodatkowo wykazały one, że w warunkach kontrolnych replikacja DNA HAdV-5 zaczyna być wykrywalna w 12 godzinie od momentu wprowadzenia wirusa do hodowli [130]. Wyniki powyższych eksperymentów posłużyły do zaprojektowania doświadczenia, w którym w analogicznym szeregu punktów czasowych do zakażonych HAdV-5 komórek dodawany był 17-AAG. Analiza półilościowa z użyciem metody WB pokazała, że zahamowanie aktywności Hsp90, poprzez dodanie inhibitora, w czasie infekcji jak również w 3, 6 i 9 godzinie od zakażenia hamuje namnażanie HAdV-5. Obserwowane zahamowanie syntezy białek do 9 godziny od zakażenia hodowli świadczy o tym, że efekt inhibicji skupia się na wczesnych procesach cyklu życiowego HAdV-5, poprzedzających replikację DNA. Uprzednie wykluczenie etapów obejmujących adsorpcję jako potencjalnych procesów zależnych od aktywności opiekuńczej Hsp90, wskazuje, że 17-AAG wpływa na proces transkrypcji genów HAdV-5, bądź na proces produkcji białek wirusowych, których synteza przebiega do 9 godziny od zakażenia. Dodatek 17-AAG w różnych punktach czasowych i badanie jego wpływu na geny, których ekspresja reprezentuje poszczególne stadia cyklu życiowego HAdV-5, pozwala na wskazanie etapu replikacji wirusa, który podatny jest na deregulację wskutek zahamowania aktywności Hsp90. Dlatego też, wykonano półilościową kwantyfikację mRNA E1A, DBP i hexonu, za pomocą reakcji PCR, w próbkach izolowanych z hodowli A549 do których inhibitor dodawany był w czasie infekcji, jak również w 3, 6, 9, 12, 15 i 24 godzinie od zakażenia. Prezentowane wyniki wskazują, że inhibicja aktywności Hsp90 w pierwszych godzinach od zakażenia powoduje zahamowanie transkrypcji wszystkich badanych genów. Inhibicja transkrypcji z promotora E1 następuje kiedy 17-AAG dodawany jest w czasie zakażenia i 3 godziny po zakażeniu. W kolejnych punktach czasowych obserwowany jest stopniowy wzrost ilości mRNA genu wczesnego. Może być to spowodowane zdolnością E1A do aktywacji transkrypcji z własnego promotora. Nawet niewielka ilość białka E1A znacznie zwiększa aktywność transkrypcji E1A, przekładając się tym samym na obserwowaną mniejszą skuteczność inhibicji transkrypcji z promotora E1A w dalszych punktach czasowych. Podobne wyniki uzyskano w badaniu ekspresji genu E1A w linii komórkowej HeLa, w których wykazano, że zastosowanie mutantów HAdV-5, w których ekspresja białka E1A jest 40-krotnie niższa w porównaniu do typu dzikiego, nie wpływa znacząco na proces replikacji wirusa. Wyniki te wskazują, że białko wczesne produkowane

jest w znacznym nadmiarze, a do inicjacji transkrypcji genów HAdV-5 wymagana jest niewielka ilość E1A [131]. Zahamowanie syntezy mRNA DBP i hexonu zachodzi kiedy 17-AAG dodawany jest odpowiednio w 9 i 12 godzinie. Zgadza się to z danymi otrzymanymi w eksperymentach, które definiowały moment inicjacji transkrypcji DBP i hexonu. Wyniki wskazują, że dodatek 17-AAG nie był skuteczny dla DBP w 12, a dla hexonu w 15 godzinie, ponieważ synteza ich mRNA w przebiegu infekcji już się rozpoczęła. Wyniki obejmujące badanie zahamowania transkrypcji zostały potwierdzone przez analizę Real-time PCR wykonaną przez zespół prof. Macieja Przybylskiego w Zakładzie Mikrobiologii Klinicznej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego [130].

5.4. Ocena udziału Hsp90 podczas wczesnych etapów replikacji HAdV-5 i interakcji z białkiem E1A

W niniejszej pracy założono, że obserwowana inhibicja replikacji HAdV-5, obniżona ilość białek, DNA oraz pośredniego i późnego mRNA jest skutkiem zahamowania aktywności białka E1A. Uzasadnieniem tego założenia, jest udział białka wczesnego w aktywacji transkrypcji z pozostałych promotorów wczesnych, jak również udział w kontroli dalszych etapów cyklu życiowego HAdV-5 przez aktywację MLP, L4P jak również modulację ekspresji genów komórkowych. Hipotezę tą potwierdzał wynik koimmunoprecypitacji, w której wykryto kompleksy Hsp90 α E46A z E1A 289R.

Linia komórkowa HEK293 wykorzystywana jest do produkcji wektorów adenowirusowych, będących deletantami E1A, ponieważ posiada gen kodujący endogenne białko wczesne i jego ekspresja z chromosomu 19 pozwala na transkomplementację i wydajne namnażanie wirusa [132]. Zjawisko transkomplementacji wykorzystane zostało dla sprawdzenia czy E1A pochodzenia komórkowego spowoduje zniesienie inhibicji ekspresji wirusowej kopii genu E1A. Wyniki pracy doktorskiej wskazują, że w hodowli zakażonych komórek A549 poddanych traktowaniu 17-AAG dochodzi do zahamowania replikacji HAdV-5, w linii HEK293 efekt inhibicji jest słabszy. Oznacza to, że obecny w HEK293 produkt białkowy genu E1A rekompensuje zahamowanie ekspresji białka pochodzenia wirusowego. Podobne wyniki otrzymano podczas badania zahamowania replikacji HAdV-5 przez związek należący do salicylanilidów – oksyklozanid. Związek ten zahamuje aktywności transkrypcyjną E1A, a widoczny spadek ilości DNA HAdV-5 tłumaczony jest pośrednią inhibicją, polegającą na zakłóceniu syntezy białek biorących udział w replikacji materiału genetycznego wirusa - DBP, Polimeraza, pTP [133]. Dowiedziona w pracy doktorskiej aktywność przeciwwirusowa 17-AAG obserwowana nawet do 9 godziny od zakażenia, nie

jest jednak spowodowana zahamowaniem transkrypcji z promotora E1A, ponieważ w przypadku genu wczesnego dodatek inhibitora skuteczny był jedynie do 3 godziny od wprowadzenia HAdV-5 do hodowli.

Na bazie otrzymanych wyników i wspomnianych doniesień literaturowych założono, że Hsp90 uczestniczy w syntezie *de novo* E1A. Wyznaczone w poprzednich eksperymentach punkty czasowe ekspresji mRNA E1A posłużyły w zaplanowaniu doświadczenia, w którym sprawdzono jak dodatek 17-AAG wpłynie na syntezę białka E1A i kodującego go RNA bezpośrednio po infekcji. Jak pokazano wcześniej, transkrypt kodujący E1A obecny jest w 3 godzinie od infekcji, zaś jego produkt białkowy pojawia się w analizie densytometrycznej WB w 4 godzinie po zakażeniu. W przeciwieństwie do wspomnianego wcześniej oksyklozanidu, którego aktywność przeciwwirusowa skupia się na zahamowaniu transkrypcji genu wczesnego, wyniki prezentowane w pracy doktorskiej pokazują, że dodatek 17-AAG powoduje inhibicję syntezy białka E1A. Nie wpływa on jednak na poziom jego mRNA, który stopniowo wzrasta wraz z wydłużającym się czasem infekcji. Oznacza to, że Hsp90 bierze udział w procesie syntezy i dojrzewania E1A.

Cykloheksamid jest związkiem organicznym, który w komórkach eukariotycznych hamuje translację RNA. CHX dodany do hodowli HEK293 hamował syntezę *de novo* białka E1A, umożliwiając tym samym obserwację wpływu 17-AAG na tempo degradacji obecnego już w komórkach białka wczesnego. Otrzymane wyniki wskazują, że zahamowanie aktywności Hsp90 nie wpływa na stabilność dojrzałego E1A. Można więc uznać, że Hsp90 jest aktywne tylko w procesie dojrzewania nowo syntetyzowanego E1A.

Uzyskane wyniki tłumaczą, dlaczego nie są obserwowane zmiany w lokalizacji E1A, mimo inhibicji Hsp90. E1A znajdujący się w cytoplazmie, pochodzący z HAdV-5 lub z nadekspresji z wprowadzonego na drodze transfekcji plazmidu, stanowi jedynie 5-10% całkowitego białka wczesnego [134]. W pracy doktorskiej udowodniono że dodatek 17-AAG nie wpływa na dominującą lokalizację jądrową dojrzałego E1A obecnego naturalnie w linii HEK293, jak również na lokalizację białka powstającego w komórkach A549 transfekowanych plazmidem z genem E1A. Ilość E1A znajduącego się w cytoplazmie, gdzie przebiega proces translacji jak również proces jego modyfikacji postranslacyjnych, jest tak niewielka, że przy zastosowanej metodzie barwienia immunofluorescencyjnego, potencjalne zmiany w lokalizacji subkomórkowej jak również zmiany ilościowe w obecności 17-AAG mogą być niewykrywalne.

5.5. Ocena przejściowej inhibicji replikacji HAdV-5 w obecności 17-AAG

Przedstawione wyniki wskazują, że inhibicja aktywności Hsp90 powoduje przejściowe zahamowanie replikacji HAdV-5. Zjawisko inhibicji obserwowane jest w pierwszych 24-godzinach od infekcji, po kolejnej dobie występuje przyspieszenie replikacji. Świadczy to o tym, że 17-AAG wykazuje działanie jedynie spowalniające propagację HAdV-5, a nie całkowite jego zahamowanie. Potwierdzają to wyniki uzyskane podczas barwień immunofluorescencyjnych, w których po 48 godzinach od zakażenia, mimo obecności 17-AAG, pojawiają się białka struktury HAdV-5. Przypadek przełamania efektu inhibicji opisany w niniejszej pracy, może być spowodowany niepełnym zahamowaniem Hsp90, przez które E1A ulega syntezie w niewielkim stopniu, jednak wraz z wydłużającym się czasem infekcji może kumulować się w komórce gospodarza do osiągnięcia ilości wystarczającej do aktywacji transkrypcji pozostałych genów. Z danych literaturowych wiadomo także, że E1A ma zdolność aktywacji transkrypcji z własnego promotora, przy obecności niewielkiej ilości białka wczesnego [131]. W badaniach nad deletantami promotora E1A wykazano, że nawet niska ekspresja E1A jest wystarczająca do wydajnego procesu replikacji [135]. Dane literaturowe wskazują również, że sama konserwatywna domena CR3, w postaci 49-aminokwasowego syntetycznego peptydu, może funkcjonować jako autonomiczny czynnik indukujący transkrypcję genów E2 HAdV-5 [136]. Ze wskazanych danych literaturowych wynika także, że izolowana domena CR3 ma zdolność również zdolność aktywacji transkrypcji z promotora MLP. Nie można wykluczyć, że białko wczesne, które nie jest w pełni dojrzałe ale ma funkcjonalną domenę CR3 może aktywować transkrypcję zarówno genu E1A jak i pozostałych genów wirusa, i przełamywać efekt inhibicji spowodowany dodatkiem 17-AAG.

5.6. Ocena udziału Hsp90 podczas późnych etapów replikacji i tworzenia się infekcyjnych cząstek HAdV-5

W pracy doktorskiej wykazano, że przedłużenie hodowli zainfekowanych komórek do 48 godzin powoduje, mimo obecności 17-AAG, sukcesywny wzrost ilości elementów budulcowych HAdV-5. Ilość białek struktury oraz DNA wirusa w komórkach gospodarza wzrasta do poziomu obserwowanego w zakażonych komórkach kontrolnych. W niniejszej pracy dowiedziono, że 17-AAG hamuje wczesne etapy, jednak nie można wykluczyć, że zakłócone zostają również późne etapy cyklu życiowego HAdV-5. Hipotezę tę potwierdzają wyniki uzyskane podczas badania efektu cytopatycznego, przeprowadzone w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego przez zespół

prowadzony przez prof. Macieja Przybylskiego. Wykazało ono, że po 48 godzinach ilość zakaźnych cząstek wirusa była 10-krotnie niższa w obecności 0,125 μM 17-AAG i 20 razy niższa w obecności 0,5 μM 17-AAG w porównaniu z ilością infekcyjnych wirionów powstałych w warunkach kontrolnych [130]. Z otrzymanych danych można wnioskować, że mimo syntezy białek jak i genomowego DNA HAdV-5, ilość tworzonych w obecności 17-AAG infekcyjnych wirionów potomnych jest mniejsza niż w hodowli kontrolnej bez inhibitora. Może być to skutkiem zakłócenia procesu składania kapsydów bądź pakowania do nich DNA HAdV-5.

W niniejszej pracy zastosowano metodę wirowania w gradiencie chlorku cezu, która posłużyła do rozdzielenia frakcji wirusów pełnych, złożonych z kapsydu i DNA od wirusów pustych. Otrzymane po ultrawiirowaniu frakcje wirusów pokazały, że przy zahamowaniu aktywności Hsp90, stosunek w pełni infekcyjnych do defektywnych cząstek był porównywalny. W warunkach kontrolnych, bez dodatku inhibitora, dominującą frakcję stanowiły kapsydy zawierające DNA. Otrzymane wyniki pokazują, że Hsp90 nie jest niezbędne w procesie pakowania DNA do kapsydu HAdV-5, ponieważ około 50% cząstek wirusa tworzonych w hodowli z inhibitorem posiada materiał genetyczny. Obserwowana jest jednak znaczna różnica w ilości pełnych kapsydów w między hodowlą kontrolną a badaną. Wynika ona prawdopodobnie z opóźnienia procesu replikacji wirusa wywołanego inhibitorem, ale nie da się całkowicie wykluczyć uczestnictwa białka opiekuńczego w procesie wprowadzania DNA do kapsydu. Temat ten wymaga dalszych badań.

Wykonano dodatkowo analizę ekspresji poszczególnych białek HAdV-5, w tym opisanych w części teoretycznej białek kluczowych w późnych procesach cyklu życiowego wirusa. Analiza densytometryczna wskazała, że inhibicja Hsp90, przez dodatek 0,5 μM 17-AAG nie powoduje destabilizacji żadnego z badanych białek. Zahamowanie aktywności opiekuńczej przez dodatek specyficznych inhibitorów skutkuje zwykle zakłóceniem procesu dojrzewania białek-klientów i ukierunkowaniem ich na drogę degradacji przez system ubikwityna-proteasom. Wykazany w pracy doktorskiej, niezmienny poziom poszczególnych białek HAdV-5 wskazuje, prawdopodobnie że nie należą one do puli klientów Hsp90. W powyższym eksperymencie nie uwzględniono analizy głównych białek kapsydu ponieważ nie udało się uzyskać ich ekspresji. Dane literaturowe wskazują, że samodzielna ekspresja wspomnianych białek nie jest możliwa [137-139]. Białko hexon wymaga do poprawnego fałdowania kotransfekcji i aktywności opiekuńczej białka 100K. Białka penton i fiber są stabilne wyłącznie w kompleksie, a syntetyzowane oddzielnie ulegają szybkiej degradacji.

Można jednak przyjąć, że tworzenie się kapsydów w komórkach hodowanych z inhibitorem pozwala na wykluczenie białek strukturalnych wirusa z grona klientów zależnych od Hsp90.

5.7. Podsumowanie

W niniejszej pracy wykazano, że aktywność opiekuńcza Hsp90 wymagana jest do wydajnego procesu replikacji HAdV-5 (Ryc.4). Efekt inhibicji zależny jest od zastosowanego stężenia specyficznego inhibitora Hsp90 – 17-AAG (Ryc.6). Prowadzone badania wykluczyły, że zahamowanie cyklu życiowego wirusa jest wynikiem nieprawidłowego procesu adsorpcji (Ryc.9) Dodatek 17-AAG w początkowych punktach czasowych zakażenia powodował zahamowanie syntezy białek struktury do 9-12 godziny oraz hamowanie transkrypcji genów E1A, DBP i hexonu do odpowiednio 3, 9 i 12 godziny od infekcji. Efekt ten był obserwowany, kiedy inhibitor dodawany był w momencie infekcji, ale zanikał gdy 17-AAG został zastosowany w kolejnych punktach czasowych (Ryc.13, Ryc.14). Wykazano, że zahamowanie cyklu życiowego HAdV-5 powodowane jest destabilizacją nowo powstającego wczesnego białka E1A, które jako pierwsze ulega transkrypcji podczas infekcji i od aktywności którego zależy ekspresja genów wczesnych i późnych HAdV-5. Dowiedziono, że dodatek 17-AAG powoduje spadek ilości białka E1A, jednak nie towarzyszy temu spadek ilości kodującego go RNA (Ryc.16). Oznacza to, że Hsp90 uczestniczy w procesie syntezy *de novo* E1A. Wniosek ten został dodatkowo potwierdzony przez stwierdzenie fizycznego wiązania Hsp90 i E1A wykrytego w koimmunoprecypitacji (Ryc.19). Zahamowanie aktywności Hsp90 nie wpłynęło na dojrzałe, wyrażane konstytutywnie białko E1A w komórkach HEK293 (Ryc.15). Oznacza to, że jedynie nowosyntetyzowane E1A zależne jest od Hsp90. Wniosek ten został poparty obserwacją, że 17-AAG nie zwiększa tempa degradacji E1A w komórkach HEK293 po zahamowaniu procesu syntezy białka przez cykloheksymid (Ryc.17). Zahamowanie namnażania HAdV-5 obserwowane jest w pierwszych 24 godzinach od zakażenia (Ryc.4). Wraz z wydłużającym się do 48 godzin czasem hodowli zainfekowanych komórek, efekt inhibicji jest przełamany i następuje sukcesywna produkcja elementów budulcowych wirusa – DNA, RNA i białek struktury. Czasowe opóźnienie replikacji może być skutkiem niepełnego zahamowania syntezy E1A, które wraz z postępującą infekcją gromadzi się w komórkach i stopniowo aktywuje transkrypcję w promotora wczesnego.

Identyfikacja Hsp90, jako czynnika komórkowego, niezbędnego do procesu replikacji HAdV-5 może być przydatna do projektowania terapii przeciwwirusowej. Stosowanie terapii nie będzie związane z powstawaniem adaptacyjnych mutacji wirusa jak również będzie się charakteryzowała szerszym spektrum działania

6. WNIOSKI

- HAdV-5 wymaga do wydajnego procesu replikacji aktywności opiekuńczej Hsp90.
- Efekt inhibicji replikacji, spowodowany dodatkiem 17-AAG, widoczny jest w momencie kiedy inhibitor dodany jest w momencie zakażenia hodowli. Zahamowanie cyklu życiowego HAdV-5 na tak wczesnym etapie nie jest jednak wynikiem zakłócenia procesu adsorpcji i internalizacji.
- Hsp90 wymagane jest do procesu translacji białka E1A, które jako pierwsze ulega transkrypcji podczas infekcji HAdV-5 i które aktywuje transkrypcję pozostałych genów wirusa.
- Hamowanie replikacji HAdV-5 przez 17-AAG ma charakter przejściowy. Przyspieszenie procesu namnażania HAdV-5 widoczne jest po 48 godzinach. Może to być spowodowane niepełnym zahamowaniem Hsp90, przez które E1A ulega syntezie w niewielkim stopniu, jednak wystarczającym aby efekt inhibicji został przełamany przez wzrastającą ilość E1A. Niewielka część E1A może również osiągać aktywną konformację bez udziału Hsp90, co mogło by wystarczyć do uruchomienia obserwowanej spowolnionej replikacji.
- Identyfikacja Hsp90, jako czynnika komórkowego, niezbędnego do procesu replikacji HAdV-5 może być przydatna do projektowania terapii przeciwwirusowej.

7. LITERATURA

1. Rowe W. P., et al., Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1953. 84(3): p. 570-3.
2. Hilleman M. R, Werner J. H., Recovery of New Agent from Patients with Acute Respiratory Illness. *Exp Biol Med*, 1953. 85(1).
3. Khanal S., Ghimire P., Dharmoon A.S., The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly. *Biomedicines*, 2018. 6(1).
4. Lahm T., Spartz H. N., Hawley D. A, Leland D. S, Wolf K. M, Twigg H. L, Oberah M.D, Fatal adenovirus serotype 21 infection associated with hemophagocytic lymphohistiocytosis and multiorgan failure. *Respir Med*, 2010. 3(4): p. 223-225.
5. Mitchell L. S., et al., Adenovirus 7a: a community-acquired outbreak in a children's hospital. *Pediatr Infect Dis J*, 2000. 19(10): p. 996-1000.
6. Lion T., Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*, 2014. 27(3): p. 441-62.
7. Gerber S. I., et al., Outbreak of adenovirus genome type 7d2 infection in a pediatric chronic-care facility and tertiary-care hospital. *Clin Infect Dis*, 2001. 32(5): p. 694-700.
8. Yu P., et al., Outbreak of acute respiratory disease caused by human adenovirus type 7 in a military training camp in Shaanxi, China. *Microbiol Immunol*, 2013. 57(8): p. 553-60.
9. Hograindleur M.A., et al., Binding Mechanism Elucidation of the Acute Respiratory Disease Causing Agent Adenovirus of Serotype 7 to Desmoglein-2. *Viruses*, 2020. 12(10).
10. Hierholzer J.C., Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev*, 1992. 5(3): p. 262-74.
11. Echavarria M., Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev*, 2008. 21(4): p. 704-15.
12. De Jong J. C., et al., Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol*, 1999. 37(12): p. 3940-5.
13. Davison A. J., Benko M., Harrach B., Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*, 2003. 84(Pt 11): p. 2895-2908.
14. Dhingra A., et al., Molecular Evolution of Human Adenovirus (HAdV) Species C. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 1039.
15. Reddy V.S., et al., Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution. *Science*, 2010. 329(5995): p. 1071-5.

16. Liu H., et al., Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks. *Science*, 2010. 329(5995): p. 1038-43.
17. van Oostrum J., Burnett R. M., Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J Virol*, 1985. 56(2): p. 439-48.
18. Vellinga J., Van der Heijdt S., Hoeben R.C., The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *J Gen Virol*, 2005. 86(Pt 6): p. 1581-1588.
19. Mathias, P., et al., Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol*, 1994. 68(10): p. 6811-4.
20. Russell W. C. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*, 2000. 81(11):p. 2573-2604
21. Russell W. C., Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol*, 2009. 90(1): p. 1-20.
22. Saha B., Wong C. M, Parks R. J., The adenovirus genome contributes to the structural stability of the virion. *Viruses*, 2014. 6(9): p. 3563-83.
23. Hatfield L., Hearing, P. Redundant elements in the adenovirus type 5 inverted terminal repeat promote bidirectional transcription in vitro and are important for virus growth in vivo. *Virology*, 1991. 184(1): p. 265-76.
24. de Jong R. N, Meijer L.A., van der Vliet P.C., DNA binding properties of the adenovirus DNA replication priming protein pTP. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(12): p. 3274-86.
25. Alba R., et al., Altering the Ad5 packaging domain affects the maturation of the Ad particles. *PLoS One*, 2011. 6(5): p. e19564.
26. Condezo G.N., et al., Structures of Adenovirus Incomplete Particles Clarify Capsid Architecture and Show Maturation Changes of Packaging Protein L1 52/55k. *J Virol*, 2015. 89(18): p. 9653-64.
27. Farley D.C., Brown J.L., Leppard K.N., Activation of the early-late switch in adenovirus type 5 major late transcription unit expression by L4 gene products. *J Virol*, 2004. 78(4): p. 1782-91.
28. Mathews M.B., Shenk T., Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *J Virol*, 1991. 65(11): p. 5657-62.
29. Mayer M. P, Recruitment of Hsp70 chaperones A crucial part of viral survival strategies. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*, 2005. 153:1-46
30. Wu E., et al., Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J Virol*, 2003. 77(13): p. 7225-35.

31. Wang H., et al., Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med*, 2011. 17(1): p. 96-104.
32. Gaggar A., Shayakhmetov D. M, Lieber A., CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med*, 2003. 9(11): p. 1408-12.
33. Arnberg N., et al., Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J Virol*, 2000. 74(1): p. 42-8.
34. Wickham T. J., et al., Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 1993. 73(2): p. 309-19.
35. Greber U. F., et al., Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 1993. 75(3): p. 477-86
36. Zhou J., et al., Role of kinesins in directed adenovirus transport and cytoplasmic exploration. *PLoS Pathog*, 2018. 14(5): p. e1007055.
37. Cassany A., et al., Nuclear import of adenovirus DNA involves direct interaction of hexon with an N-terminal domain of the nucleoporin Nup214. *J Virol*, 2015. 89(3): p. 1719-30.
38. Spector D. J., McGrogan M., Raskas H.J., Regulation of the appearance of cytoplasmic RNAs from region 1 of the adenovirus 2 genome. *J Mol Biol*, 1978. 126(3): p. 395-414.
39. Nevins J.R., Regulation of early adenovirus gene expression. *Microbiol Rev*, 1987. 51(4): p. 419-30.
40. Swaminathan, S., Thimmapaya B., Transactivation of adenovirus E2-early promoter by E1A and E4 6/7 in the context of viral chromosome. *J Mol Biol*, 1996. 258(5): p. 736-46.
41. Moise A.R., et al., Adenovirus E3-6.7K maintains calcium homeostasis and prevents apoptosis and arachidonic acid release. *J Virol*, 2002. 76(4): p. 1578-87.
42. Krajcsi P., et al., The adenovirus E3-14.7K protein and the E3-10.4K/14.5K complex of proteins, which independently inhibit tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis, also independently inhibit TNF-induced release of arachidonic acid. *J Virol*, 1996. 70(8): p. 4904-13.
43. Zhao H., Chen M., Pettersson U., A new look at adenovirus splicing. *Virology*, 2014. 456-457: p. 329-41.
44. Cheng P.H., et al., Oncolytic Replication of E1b-Deleted Adenoviruses. *Viruses*, 2015. 7(11): p. 5767-79.
45. Chow L. T., Broker T. R., Lewis J.B., Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2. *J Mol Biol*, 1979. 134(2): p. 265-303
46. Stephens C., Harlow E., Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 kd and 35 kd proteins. *EMBO J*, 1987. 6(7): p. 2027-35.

47. Ulfendahl P.J., et al., A novel adenovirus-2 E1A mRNA encoding a protein with transcription activation properties. *EMBO J*, 1987. 6(7): p. 2037-44.
48. Miller M.S., et al., Characterization of the 55-residue protein encoded by the 9S E1A mRNA of species C adenovirus. *J Virol*, 2012. 86(8): p. 4222-33.
49. Green M., Panesar N. K., Loewenstein P. M., The transcription-repression domain of the adenovirus E1A oncoprotein targets p300 at the promoter. *Oncogene*, 2008. 27(32): p. 4446-55.
50. Sang N., Caro J., Giordano A., Adenoviral E1A: everlasting tool, versatile applications, continuous contributions and new hypotheses. *Front Biosci*, 2002. 7: p. d407-13.
51. Fattaey A.R., Harlow E., Helin K., Independent regions of adenovirus E1A are required for binding to and dissociation of E2F-protein complexes. *Mol Cell Biol*, 1993. 13(12): p. 7267-77.
52. Ferrari R., et al., Epigenetic reprogramming by adenovirus e1a. *Science*, 2008. 321(5892): p. 1086-8.
53. Kraus V. B., et al., Interaction of the Dr1 inhibitory factor with the TATA binding protein is disrupted by adenovirus E1A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994. 91(14): p. 6279-82.
54. Seifried L. A., et al., pRB-E2F1 complexes are resistant to adenovirus E1A-mediated disruption. *J Virol*, 2008. 82(9): p. 4511-20.
55. Johnson L., et al., Selectively replicating adenoviruses targeting deregulated E2F activity are potent, systemic antitumor agents. *Cancer Cell*, 2002. 1(4): p. 325-37.
56. Huang M. M., Hearing P., The adenovirus early region 4 open reading frame 6/7 protein regulates the DNA binding activity of the cellular transcription factor, E2F, through a direct complex. *Genes Dev*, 1989. 3(11): p. 1699-710.
57. Frisch S. M., Mymryk J. S., Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(6): p. 441-52.
58. Loewenstein P. M., et al., The adenovirus E1A N-terminal repression domain represses transcription from a chromatin template in vitro. *Virology*, 2012. 428(1): p. 70-5.
59. Schaack J., Guo X., Langer S. J., Characterization of a replication-incompetent adenovirus type 5 mutant deleted for the preterminal protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(25): p. 14686-91.
60. Mysiak M. E., Holthuizen P. E., van der Vliet P. C., The adenovirus priming protein pTP contributes to the kinetics of initiation of DNA replication. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(13): p. 3913-20.

61. Leegwater P. A., Rombouts R. F., van der Vliet P. C., Adenovirus DNA replication in vitro: duplication of single-stranded DNA containing a panhandle structure. *Biochim Biophys Acta*, 1988. 951(2-3): p. 403-10.
62. van der Vliet P. C., Keegstra W., Jansz H. S., Complex formation between the adenovirus type 5 DNA-binding protein and single-stranded DNA. *Eur J Biochem*, 1978. 86(2): p. 389-98.
63. Nevins J. R., Wilson M.C., Regulation of adenovirus-2 gene expression at the level of transcriptional termination and RNA processing. *Nature*, 1981. 290(5802): p. 113-8.
64. Morris S. J., Scott G.E., Leppard K.N., Adenovirus late-phase infection is controlled by a novel L4 promoter. *J Virol*, 2010. 84(14): p. 7096-104.
65. Nevins J.R., Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell*, 1981. 26(2 Pt 2): p. 213-20.
66. Babich A., et al., Effect of adenovirus on metabolism of specific host mRNAs: transport control and specific translational discrimination. *Mol Cell Biol*, 1983. 3(7): p. 1212-21 62
67. Yueh A., Schneider R. J., Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells. *Genes Dev*, 1996. 10(12): p. 1557-67.
68. Xi, Q., Cuesta R., Schneider R. J., Regulation of translation by ribosome shunting through phosphotyrosine-dependent coupling of adenovirus protein 100k to viral mRNAs. *J Virol*, 2005. 79(9): p. 5676-83.
69. Aparicio O., et al., Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production. *J Virol*, 2006. 80(3): p. 1376-84.
70. Clemens M. J., Regulation of eukaryotic protein synthesis by protein kinases that phosphorylate initiation factor eIF-2. *Mol Biol Rep*, 1994. 19(3): p. 201-10.
71. Whittaker G. R., Kann M., Helenius A., Viral entry into the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000. 16: p. 627-51.
72. Cuervo A., Dauden M. I., Carrascosa J. L., Nucleic acid packaging in viruses. *Subcell Biochem*, 2013. 68: p. 361-94.
73. Garber E. A., Seidman M. M., Levine A. J., Intracellular SV40 nucleoprotein complexes: synthesis to encapsidation. *Virology*, 1980. 107(2): p. 389-401.
74. Rancourt C., et al., Proline 137 is critical for adenovirus protease encapsidation and activation but not enzyme activity. *Virology*, 1995. 209(1): p. 167-73.
75. Diouri M., et al., Cleavage efficiency by adenovirus protease is site-dependent. *J Biol Chem*, 1996. 271(51): p. 32511-4.

76. Hammarskjold M. L., Winberg G., Encapsidation of adenovirus 16 DNA is directed by a small DNA sequence at the left end of the genome. *Cell*, 1980. 20(3): p. 787-95.
77. Yang T. C., Maluf N. K., Cooperative heteroassembly of the adenoviral L4-22K and IVa2 proteins onto the viral packaging sequence DNA. *Biochemistry*, 2012. 51(7): p. 1357-68.
78. Doronin K., et al., Overexpression of the ADP (E3-11.6K) protein increases cell lysis and spread of adenovirus. *Virology*, 2003. 305(2): p. 378-87.
79. Tollefson A. E., et al., The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol*, 1996. 70(4): p. 2296-306.
80. Brown M. T., et al., Actin can act as a cofactor for a viral proteinase in the cleavage of the cytoskeleton. *J Biol Chem*, 2002. 277(48): p. 46298-303.
81. Khalili K., Weinmann R., Shut-off of actin biosynthesis in adenovirus serotype-2-infected cells. *J Mol Biol*, 1984. 175(4): p. 453-68.
82. Sreedhar A.S., et al., Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett*, 2004. 562(1-3): p. 11-5.
83. Bohush A., Bieganski P., Filipek A., Hsp90 and Its Co-Chaperones in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(20):116. Prodromou, C., Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J*, 2016. 473(16): p. 2439-52
84. Young J. C., Obermann W. M., Hartl F. U., Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J Biol Chem*, 1998. 273(29): p. 18007-10.
85. Bergerat A., et al., An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, 1997. 386(6623): p. 414-7.
86. Prodromou C., Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J*, 2016. 473(16): p. 2439-52.
87. Jakob U., et al., Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J Biol Chem*, 1995. 270(13): p. 7288-94.
88. Metchat A., et al., Mammalian heat shock factor 1 is essential for oocyte meiosis and directly regulates Hsp90alpha expression. *J Biol Chem*, 2009. 284(14): p. 9521-8.
89. Garnier C., et al., Phosphorylation and oligomerization states of native pig brain HSP90 studied by mass spectrometry. *Eur J Biochem*, 2001. 268(8): p. 2402-7.
90. Zou M., et al., Evolutionarily conserved dual lysine motif determines the non-chaperone function of secreted Hsp90alpha in tumour progression. *Oncogene*, 2017. 36(15): p. 2160-2171.

91. Somji S., et al., Expression of hsp 90 in the human kidney and in proximal tubule cells exposed to heat, sodium arsenite and cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 2002. 133(2-3): p. 241-54.
92. Voss A. K., Gruss T. T., Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*, 2000. 127(1): 1-11.
93. Donnelly A., Blagg B. S., Novobiocin and additional inhibitors of the Hsp90 C-terminal nucleotide-binding pocket. *Curr Med Chem*, 2008. 15(26): p. 2702-17.
94. Krukenberg K. A., et al., Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Q Rev Biophys*, 2011. 44(2): p. 229-55.
95. Chen S., Smith D. F., Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, 1998. 273(52): p. 35194-200.
96. Bhattacharya K., et al., The Hsp70-Hsp90 co-chaperone Hop/Stip1 shifts the proteostatic balance from folding towards degradation. *Nat Commun*, 2020. 11(1): p. 5975.
97. Panaretou B., et al., Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol Cell*, 2002. 10(6): p. 1307-18.
98. Prodromou C., The 'active life' of Hsp90 complexes. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1823(3): p. 614-23.
99. Whitesell L., et al., Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(18): p. 8324-8.
100. Yuno A., et al., Clinical Evaluation and Biomarker Profiling of Hsp90 Inhibitors. *Methods Mol Biol*, 2018. 1709: p. 423-441.
101. Supko J. G., et al., Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1995. 36(4): p. 305-15.
102. Sasaki K., Yasuda H., Onodera K., Growth inhibition of virus transformed cells in vitro and antitumor activity in vivo of geldanamycin and its derivatives. *J Antibiot (Tokyo)*, 1979. 32(8): p. 849-51.
103. Becker B., et al., Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases. *Exp Dermatol*, 2004. 13(1): p. 27-32.
104. Sanchez J., et al., Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone. *Curr Cancer Drug Targets*, 2020. 20(4): p. 253-270.
105. Park H. K., et al., Unleashing the full potential of Hsp90 inhibitors as cancer therapeutics through simultaneous inactivation of Hsp90, Grp94, and TRAP1. *Exp Mol Med*, 2020. 52(1): p. 79-91.

106. Mishra S. J., et al., Selective Inhibition of the Hsp90alpha Isoform. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021. 60(19): p. 10547-10551.
107. Geller R., Taguwa S., Frydman J., Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1823(3): p. 698-706.
108. zur Wiesch P. A., et al., Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases. *Lancet Infect Dis*, 2011. 11(3): p. 236-47.
109. Campos A. B., et al., Human cytomegalovirus antiviral drug resistance in hematopoietic stem cell transplantation: current state of the art. *Rev Med Virol*, 2016. 26(3): p. 161-82.
110. BreLOT A., Chakrabarti L.A., CCR5 Revisited: How Mechanisms of HIV Entry Govern AIDS Pathogenesis. *J Mol Biol*, 2018. 430(17): p. 2557-2589
111. Geller R., et al., Evolutionary constraints on chaperone-mediated folding provide an antiviral approach refractory to development of drug resistance. *Genes Dev*, 2007. 21(2): p. 195-205.
112. Geller R., Andino R., Frydman J., Hsp90 inhibitors exhibit resistance-free antiviral activity against respiratory syncytial virus. *PLoS One*, 2013. 8(2): p. e56762.
113. Reyes-Del Valle J., Chávez-Salinas S., Medina F., Del Angel R. M., Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J.Virol*, 2005. 79(8): p.4557-67
114. Hirsch R. C., Lavine J. E., Chang L. J., Varmus H. E., Ganem D., Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature*, 1990. 6266(344): p. 552 – 5.
115. Naito T., Momose F., Kawaguchi A., Nagata K., Involvement of Hsp90 in Assembly and Nuclear Import of Influenza Virus RNA Polymerase Subunits. *J.Virol*, 2007. 81(3): p.1339-49
116. Burch A. D., Weller S. K., Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Polymerase Requires the Mammalian Chaperone Hsp90 for Proper Localization to the Nucleus. *J.Virol*, 2005. 79(16): 10740–9.
117. Seidman M., Garber E., Levine A.J., Parameters affecting the stability of SV40 virions during the extraction of nucleoprotein complexes. *Virology*, 1979. 95(1): p. 256-9.
118. Chomczynski P., Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987. 162(1): p. 156-9.
119. Seidman, C. E., Struhl K., Introduction of plasmid DNA into cells. *Curr Protoc Protein Sci*, 2001. Appendix 4: p. 4D.
120. Zurawska A., et al., Mutations that increase both Hsp90 ATPase activity in vitro and Hsp90 drug resistance in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1803(5): p. 575-83.

121. Minota S., et al., Autoantibodies to the heat-shock protein hsp90 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 1988. 81(1): p. 106-9.
122. Bansal G. S., Norton P.M., Latchman D.S., The 90-kDa heat shock protein protects mammalian cells from thermal stress but not from viral infection. *Exp Cell Res*, 1991. 195(2): p. 303-6.
123. Oppermann H., Levinson W., Bishop J.M., A cellular protein that associates with the transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat-shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(2): p. 1067-71.
124. Chai K., et al., Heat shock protein 90 inhibitors augment endogenous wild-type p53 expression but down-regulate the adenovirally-induced expression by inhibiting a proteasome activity. *Oncotarget*, 2018. 9(40): p. 26130-26143. .
125. Taherian A., et al., Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2011. 11: p. 293.
126. Sharma P., et al., Accessibility of the coxsackievirus and adenovirus receptor and its importance in adenovirus gene transduction efficiency. *J Gen Virol*, 2012. 93(Pt 1): p. 155-158.
127. Chen Z., et al., Expression of the coxsackie and adenovirus receptor in human lung cancers. *Tumour Biol*, 2013. 34(1): p. 17-24.
128. Bergelson J. M., et al., Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 1997. 275(5304): p. 1320-3.
129. Crisostomo L., et al., Temporal dynamics of adenovirus 5 gene expression in normal human cells. *PLoS One*, 2019. 14(1): p. e0211192.
130. Dalidowska I., et al., Heat Shock Protein 90 Chaperones E1A Early Protein of Adenovirus 5 and Is Essential for Replication of the Virus. *Int J Mol Sci*, 2021. 22(4).
131. Hitt M.M. , Graham F. L, Adenovirus E1A under the control of heterologous promoters: wide variation in E1A expression levels has little effect on virus replication. *Virology*, 1990. 179(2): p. 667-78.
- 132.. Kovesdi I. , Hedley S. J. , Adenoviral producer cells. *Viruses*, 2010. 2(8): p. 1681-703.
133. Marrugal-Lorenzo J. A., et al., Repositioning salicylanilide anthelmintic drugs to treat adenovirus infections. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 17.

134. Madison D. L., et al., Acetylation of the adenovirus-transforming protein E1A determines nuclear localization by disrupting association with importin- α . *J Biol Chem*, 2002. 277(41): p. 38755-63.
135. Zheng X, et al., Adenoviral E1a expression levels affect virus-selective replication in human cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 2005. 4(11): p. 1255-62.
136. Green M., Loewenstein P. M., Puztai R., Symington J. S., An adenovirus E1A protein domain activates transcription in vivo and in vitro in the absence of protein synthesis. *Cell*, 1988. 53(6): p. 921-926
137. Bremner K. H., Scherer J., Yi J, Vershinin M., Gross S. P, Vallee R. B., Adenovirus Transport via Direct Interaction of Cytoplasmic Dynein with the Viral Capsid Hexon Subunit. *Cell Host & Microbe*, 2009. 6(6): p.523-535
138. Zubieta C, Schoehn G, Chroboczek J, Cusack S, The Structure of the Human Adenovirus 2 Penton. *Mol. Cell*. 2005. 17(1): p. 121–135
139. Karayan L., Gay B., Gerfaux J., Boulanger P. A., Oligomerization of recombinant penton base of adenovirus type 2 and its assembly with fiber in baculovirus-infected cells. *Virology*, 1994. 202(2) : p. 782-795