

# **Regulatorowa rola ligazy Pellino3 w szlakach sygnałowych RIG-I aktywowanych wirusem grypy typu B**

Receptory RIG-I-podobne (RLR) stanowią ważną rodzinę receptorów cytozolowych rozpoznających dwuniciowe RNA (dsRNA) obecne w komórce w trakcie infekcji wirusowych. W skład rodziny receptorów RLR wchodzi trzy receptory: receptor RIG-I (ang. *retinoic acid inducible gene 1*), receptor MDA5 (ang. *melanoma differentiation-associated protein 5*) oraz LGP2 (ang. *laboratory of genetics and physiology 2*), z czego jedynie RIG-I oraz MDA5 mają zdolność indukcji przeciwwirusowych kaskad sygnałowych. Po rozpoznaniu cząsteczki dsRNA receptory te oddziałują z białkiem adaptorowym MAVS (ang. *mitochondrial antiviral signaling protein*), poprzez domeny CARD (ang. *caspase activation and recruitment domain*) obecne zarówno w receptorach RIG-I i MDA5 jak i w białku MAVS. Następnie, do utworzonego kompleksu sygnałowego rekrutowane są kolejne białka cytozolowe, co prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain*) oraz IRF3/7 (ang. *interferon regulatory factor*) skutkując produkcją cytokin prozapalnych i interferonów. Ścieżki sygnałowe receptorów RLR regulowane są na wielu etapach przez ubikwitynację. Ubikwitynacja odpowiednich białek może promować tworzenie kompleksów sygnałowych aktywując kolejne kaskady sygnałowe lub kierować białka do degradacji, co w konsekwencji skutkuje zahamowaniem produkcji cytokin prozapalnych i interferonów.

Celem niniejszej pracy było zbadanie roli ligazy ubikwityny Pellino3 w regulacji szlaku sygnałowego receptora RIG-I aktywowanego infekcją wirusem grypy typu B. Rola tej ligazy została dotychczas opisana w szlakach sygnałowych receptorów TLR3 (ang. *Toll-like receptor*), TLR2, TLR4, NOD2 (ang. *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*), TNFR (ang. *tumor necrosis factor receptor 1*) oraz RIG-I. Badania te prowadzone były z wykorzystaniem mysich makrofagów lub ludzkich komórek monocytarnych. Jednak w procesach odpornościowych indukowanych infekcją wirusową niezwykle istotną funkcję pełnią również komórki nabłonka. Biorąc pod uwagę różne funkcje pełnione przez komórki odpornościowe oraz komórki nabłonka, do badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykorzystano ludzką linię komórkową pochodzącą z nabłonka płuc.

W pierwszym etapie badań zaobserwowano, że brak ligazy Pellino3 w komórkach skutkuje zwiększoną ekspresją i produkcją interferonów typu I w odpowiedzi na infekcję wirusem grypy typu B (IBV). Następnie ustalono, że receptor RIG-I pełni nadrzędną rolę w rozpoznawaniu wirusa IBV. Stosując specyficzny ligand receptora RIG-I potwierdzono, że obserwowane różnice w wydzielaniu interferonu indukowane zakażeniem wirusowym zależne są od tego receptora. Wykazano również, że brak białka Pellino3 nie wpływa na poziom ekspresji receptora RIG-I oraz białka adaptorowego MAVS.

Kolejny etap badań miał na celu określenie, która ze ścieżek sygnałowych zależna od receptora RIG-I regulowana jest przez ligazę Pellino3. Wykazano, że infekcja wirusem IBV powoduje aktywację kinaz ERK 1/2 oraz p38, jednak aktywacja ta jest niezależna od ligazy Pellino3. Zaobserwowano, że infekcja wirusem IBV nie aktywuje ścieżki NF- $\kappa$ B, ale prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego IRF3. Ponadto wykazano że ligaza Pellino3 jest

negatywnym regulatorem aktywacji tego czynnika transkrypcyjnego. Zaobserwowano również, że infekcja wirusem IBV prowadzi do aktywacji czynników kompleksu AP-1 (ATF-2 oraz c-Jun), jednak aktywacja ta jest niezależna od ligazy Pellino3.

Dalsze badania wykazały, że w komórkach z nokautem genu *PELI3* poziom białka TRAF3 zwiększa się w trakcie infekcji. W kolejnym etapie ustalono, że ligaza Pellino3 oddziałuje z białkiem TRAF3 oraz odpowiedzialna jest za ubikwitynację tego białka, tworząc rozgałęzienia ubikwityny w miejscach K48.

W ostatnim etapie badań wykazano, że obecność ligazy Pellino3 wpływa na inne aspekty odpowiedzi przeciwwirusowej indukowane produkcją interferonów typu I, takie jak aktywacja czynnika transkrypcyjnego STAT1 czy produkcja CXCL10.

Przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki pozwoliły na zaproponowanie modelu, w którym ligaza Pellino3 reguluje poziom białka TRAF3, poprzez jego ubikwitynację z rozgałęzieniami w miejscach K48, kierując je do proteasomalnej degradacji. Uniemożliwia to interakcję TRAF3 z czynnikiem transkrypcyjnym IRF3, a tym samym jego aktywację i translokację do jądra komórkowego, czego skutkiem jest zahamowanie ekspresji interferonów typu I. W konsekwencji zmniejszona produkcja interferonów typu I prowadzi do zmniejszonej aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT1 i zahamowania aktywacji transkrypcji ISG (ang. *interferon-stimulated gene*), w tym CXCL10. W proponowanym szlaku sygnałowym ligaza Pellino3 pełni rolę czynnika ograniczającego aktywację kaskady sygnałowej, zapobiegając nadmiernemu pobudzeniu komórki w wyniku infekcji wirusowej.