



MGR INŻ. ANNA KULA

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

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. inż. Jakub Siednienko

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej

im. Ludwika Hirsfelda

Polska Akademia Nauk

WROCLAW 2022

Pragnę serdecznie podziękować:

Panu dr hab. Jakubowi Siednienko

za wprowadzenie mnie w świat szlaków sygnałowych, możliwość realizacji pracy doktorskiej pod swoją opieką, za cenne wskazówki merytoryczne oraz praktyczne, cierpliwość i życzliwość

Pani dr Edycie Makuch *za ogromne wsparcie na każdym etapie przygotowania niniejszej pracy i liczne wskazówki podczas pisania rozprawy*

Panu Profesorowi dr hab. Andrzejowi Gamianowi *za przyjęcie mnie pod swoją opiekę na początku mojej doktoranckiej przygody*

Panu dr Tomaszowi Lipińskiemu *za możliwość realizacji niniejszej pracy w swoim zespole badawczym*

Zespołowi Badawczemu Bioinżynierii Łukasiewicz-PORT *za serdeczną atmosferę i pomoc w powstaniu niniejszej pracy*

Mężowi, przyjaciółom i całej rodzinie

za wsparcie w chwilach zwątpienia i cierpliwość.

Spis publikacji oraz wystąpień konferencyjnych

PUBLIKACJE

1. Brodowski M, Kowalski M, Skwarecka M, Pałka K, Skowicki M, **Kula A**, Lipiński T, Dettlaff A, Ficek M, Ryl J, Dziąbowska K, Nidzworski D, Bogdanowicz R. Highly selective impedimetric determination of Haemophilus influenzae protein D using maze-like boron-doped carbon nanowall electrodes. *Talanta*. 2021 Jan 1;221:121623. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121623. Epub 2020 Sep 9. PMID: 33076151. IF=6,1
2. Reniewicz P, **Kula A**, Makuch E, Ochnik M, Lipiński T, Siednienko J. Ligase Pellino3 Regulates Macrophage Action and Survival in Response to VSV Infection in RIG-I-Dependent Path. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6668463. Published 2021 Jul 1. doi:10.1155/2021/6668463
IF=7,31
3. **Kula A**, Makuch E, Reniewicz P, Lipiński T, Siednienko J. Pellino3 ligase negatively regulates RIG-I signaling through downregulation of TRAF3 mediated induction of the transcription factor IRF3 and IFN β production. **manuskrypt w recenzji**

WYSTĄPIENIA KONFERENCYJNE

1. **Kula A**, Makuch E, Siednienko J. Pellino3 is engaged in STAT1 dependent IL-6 expression during influenza B virus infection. The XXVIII International Symposium Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes in the Organism. 18.09.2021

Praca współfinansowana w ramach projektu **SONATA BIS**
Narodowego Centrum Nauki nr UMO-2015/18/E/NZ3/00695



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Spis Treści

1. Streszczenie	1
2. Abstract	3
3. Wykaz skrótów	5
4. Wstęp.....	8
4.1. Wprowadzenie.....	8
4.2. Receptory Toll-podobne.....	9
4.2.1. TLR3	12
4.2.2. TLR7	13
4.2.3. TLR8	14
4.2.4. TLR9	15
4.3. Receptory RIG-I podobne	16
4.3.1. RIG-I	17
4.3.2. MDA5.....	19
4.3.3. LGP2	19
4.3.4. Szlaki sygnałowe aktywowane przez receptory RLR	20
4.4. Rola interferonu w odpowiedzi przeciwwirusowej.....	21
4.5. Rola ubikwitynacji w odpowiedzi przeciwwirusowej zależnej od receptorów RLR....	24
4.6. Ligazy ubikwityny E3 z rodziny Pellino	26
4.6.1. Pellino1.....	27
4.6.2. Pellino2.....	28
4.6.3. Pellino3.....	29
5. Cel pracy.....	32
6. Materiały i metody.....	33
6.1. Materiały	33
6.1.1. Odczynniki chemiczne i reagenty	33
6.1.2. Zestawy gotowe.....	35
6.1.3. Bufory i żele	35
6.1.4. Startery do PCR.....	36
6.1.5. Przeciwciała	37
6.1.6. Plazmidy.....	39

6.1.7. Linie komórkowe	39
6.1.8. Wirus grypy typu B	40
6.1.9. Aparatura, akcesoria i programy komputerowe	41
6.2. Metody	41
6.2.1. Hodowle komórkowe	41
6.2.2. Namnażanie wirusów	42
6.2.3. Oznaczanie miana wirusów	42
6.2.4. Przygotowanie plazmidów	42
6.2.5. Analiza ekspresji genów	43
6.2.6. Western Blotting	45
6.2.7. Oznaczenie poziomu aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF	46
6.2.8. Oznaczanie poziomu biologicznie aktywnych interferonów typu I (Bioassay).....	46
6.2.9. Oznaczanie poziomu chemokiny CXCL10.....	47
6.2.10. Badanie oddziaływania Pellino3 z TRAF3	47
6.3. Badanie ubiquitynacji TRAF3.....	48
6.3.1. Analiza statystyczna	49
7. Wyniki.....	50
7.1. Badanie roli ligazy ubiquityny Pellino3 w produkcji interferonu typu I indukowanego podczas infekcji wirusem grypy typu B	50
7.2. Badanie roli receptorów z rodziny RLR w odpowiedzi przeciwwirusowej indukowanej infekcją wirusem grypy typu B	51
7.3. Badanie roli ligazy Pellino3 w szlaku sygnałowym zależnym od receptora RIG-I.....	52
7.3.1. Rola ligazy ubiquityny Pellino3 w produkcji interferonów typu I w odpowiedzi na stymulację receptora RIG-I	52
7.3.2. Analiza fenotypu linii komórkowej A549 typu dzikiego oraz <i>PELI3</i> ^{-/-}	53
7.4. Badanie roli ligazy Pellino3 w aktywacji wybranych MAP kinaz w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B	54
7.5. Badanie roli ligazy Pellino3 w aktywacji kluczowych dla produkcji IFN typu I czynników transkrypcyjnych.....	56
7.5.1. Aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB	56
7.5.2. Aktywacja czynników regulujących interferon (IRF3/7).....	58
7.5.3. Aktywacja czynników należących do rodziny AP-1.....	58

7.6. Badanie wpływu ligazy Pellino3 na poziom czynników związanych z receptorem TNF – TRAF3 oraz TRAF6.....	59
7.6.1. Analiza poziomu czynników TRAF3 oraz TRAF6 w komórkach A549.....	60
7.6.2. Badanie oddziaływania ligazy Pellino3 z TRAF3	61
7.6.3. Analiza ubiquitynacji TRAF3 przez ligazę Pellino3.....	62
7.7. Badanie wpływu ligazy Pellino3 na aktywację czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT podczas infekcji wirusowej	63
7.8. Badanie wpływu ligazy Pellino3 na produkcję CXCL10 podczas infekcji wirusowej.	65
8. Podsumowanie wyników	67
9. Dyskusja.....	68
10. Wnioski	76
11. Spis rysunków	77
12. Literatura	79

1. Streszczenie

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- κ 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- κ 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.

2. Abstract

RIG-I-like receptors (RLRs) are an important family of pattern recognition receptors that are involved in recognition of viral infection. These cytosolic receptors are responsible for recognizing double-stranded RNA (dsRNA) present in a cell during viral infection. The RLRs family consists of a three receptors: RIG-I receptor (retinoic-acid inducible gene), MDA5 receptor (melanoma differentiation-associated protein) and LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2), but only RIG-I and MDA5 have the ability to induce antiviral signaling cascades. Upon dsRNA recognition, receptors interact with MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) through the CARD domains (caspase activation and recruitment domain) present in the RIG-I and MDA5 receptors and in the MAVS protein. Subsequently, downstream cytosolic proteins are recruited to the signaling complex, which leads to the activation of transcription factors, such as NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain) and IRF3/7 (interferon regulatory factor), resulting in the production of proinflammatory cytokines and interferons. RLR signaling pathways are regulated by posttranslational modifications such as ubiquitination. Ubiquitination of the appropriate proteins may promote the formation of signaling complexes which activates subsequent signaling cascades or direct proteins to degradation, which consequently results in the inhibition of proinflammatory cytokines and interferons production.

The aim of this study was to investigate the role of Pellino3 ubiquitin ligase in the regulation of the RIG-I receptor signaling pathway activated by infection with influenza B virus. So far, the role of this ligase has been described in the signaling pathways of TLR3 (Toll-like receptor), TLR2, TLR4, NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2), TNFR (tumor necrosis factor receptor 1) and RIG-I. These studies were conducted using mouse macrophages or human monocytic cells. However, epithelial cells also play an extremely important role in immune processes induced by viral infection. Given the different functions of immune cells and epithelial cells, a human cell line derived from lung epithelium was used in this study.

In the first stage of this work, it was observed that the lack of Pellino3 ligase in cells resulted in increased expression and production of type I interferons in response to influenza B virus (IBV) infection. Subsequently, it was established that the RIG-I receptor plays a pivotal role in the IBV recognition. Using a specific ligand for the RIG-I receptor, it was confirmed that the observed differences in the interferon secretion induced by viral infection are RIG-I receptor dependent. It has also been shown that the lack of the Pellino3 protein does not affect the expression level of the RIG-I receptor and the MAVS adapter protein.

The aim of the next stage of research was to determine which of the signaling pathways dependent on the RIG-I receptor are regulated by the Pellino3 ligase. It has been shown that IBV infection causes activation of ERK 1/2 and p38 kinases, however, this activation is independent of Pellino3 ligase. It has been observed that IBV infection does not activate the NF- κ B pathway but leads to activation of the transcription factor IRF3. Furthermore, Pellino3 ligase has been shown to be a negative regulator of the activation of this transcription factor. It has also been observed that infection with IBV leads to activation of the AP-1 complex factors (ATF-2 and c-Jun), however, this activation is independent of the Pellino3 ligase.

Further studies showed that in cells with knockout of *PELI3* gene, the level of TRAF3 increases during infection. In the next steps, it was found that the Pellino3 ligase interacts with the TRAF3 and is responsible for the K48-linked ubiquitination of this protein.

In the final stage of the study, it was shown that the presence of Pellino3 ligase influences other aspects of the antiviral response induced by the production of type I interferons, such as activation of the transcription factor STAT1 and production of CXCL10.

The results presented in this dissertation allowed to propose a model in which Pellino3 ligase regulates the level of TRAF3 protein by K48-linked ubiquitination, leading to proteasomal degradation. This prevents the interaction of TRAF3 with the IRF3, and thus its activation and translocation to the cell nucleus, which results in inhibited expression of type I interferons. Consequently, reduced production of type I interferons leads to reduced activation of the transcription factor STAT1 and inhibition of transcription activation of ISGs (interferon-stimulated gene), including CXCL10. In the proposed signaling pathway, Pellino3 ligase acts as a limiting factor in the activation of the signaling cascade, preventing overstimulation of the cell by viral infection.

3. Wykaz skrótów

- A549** ang. *adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*, linia komórkowa ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc
- AP-1** ang. *activator protein 1*, czynnik transkrypcyjny będący heterodimerem białek z rodziny Fos, Jun, ATF
- ATF-2** ang. *activating transcription factor 2*, aktywujący czynnik transkrypcyjny 2
- ATP** adenozyno-5'-trifosforan
- CARD** ang. *caspase activation and recruitment domain*, domena aktywacji i rekrutacji kaspazy
- c-Jun** czynnik transkrypcyjny
- CpG** niemetylowane dinukleotydy cytozyno-guaninowe
- CREB** ang. *cyclic AMP-responsive element-binding protein*, białko wiążące element odpowiedzi na cAMP
- CTD** ang. *C-terminal domain*, domena C-końcowa
- CXCL10** ligand chemokiny 10 motywu CXC
- DAMP** ang. *damage-associated molecular patterns*, wzorce molekularne związane z uszkodzeniem/zagrożeniem
- DISK** ang. *death-inducing signaling complex*, kompleks sygnalizacyjny indukujący śmierć
- DNA** kwas deoksyrybonukleinowy
- dsRNA** dwuniciowy kwas rybonukleinowy
- ECD** ang. *extracellular domain*, domena zewnątrzkomórkowa
- Elk-1** ang. *ETS-like 1 transcription factor*, czynnik transkrypcyjny
- EMCV** ang. *encephalomyocardis virus*, wirus zapalenia mózgu i mięśnia sercowego
- ERK** ang. *extracellular signal regulated kinases*, kinazy białkowe regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi
- FADD** ang. *FAS-associated death domain protein*, białko z domeną DEATH związane z FAS
- FHA** ang. *forkhead-associated domain*, domena odpowiedzialna za interakcje między białkami
- IBV** ang. *influenza B virus*, wirus grypy typu B
- IFN** interferon
- IKK** ang. *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*, kinaza fosforylująca podjednostkę inhibitorową NF-κB
- IL** interleukina
- IL-R** receptor interleukiny
- IRAK** ang. *interleukin-1 receptor-associated kinase*, kinaza związana z receptorem dla interleukiny 1
- IRF** ang. *interferon regulatory factor*, czynnik regulujący interferon
- ISG** ang. *interferon stimulated gene*, gen stymulowany interferonem

- ISRE** ang. *interferon-sensitive response element*,
element odpowiedzi stymulowany interferonem
- IκBα** ang. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*, podjednostka inhibitorowa czynnika NF-κB
- JNK** ang. *c-Jun N-terminal kinase 1*,
N-końcowa kinaza czynnika transkrypcyjnego c-Jun
- kDa** kilodalton, jednostka masy atomowej
- LGP2** ang. *laboratory of genetics and physiology 2*,
laboratorium genetyki i fizjologii 2; receptor z rodziny RLR
- LPS** lipopolisacharyd
- LRR** ang. *leucine-rich repeat*, domena bogata w powtórzenia leucyny
- MAP** ang. *mitogen-activated protein*, białka aktywowane mitogenami
- MAVS** ang. *mitochondrial antiviral-signaling protein*,
mitochondrialne białko przeciwwirusowego szlaku sygnałowego
- MDA5** ang. *melanoma differentiation-associated protein 5*,
białko związane z różnicowaniem czerniaka; receptor z rodziny RLR
- MOI** ang. *multiplicity of infection*, wielokrotność infekcji
- Myd88** ang. *myeloid differentiation primary response 88*,
białko adaptorowe receptorów TLR
- NEMO** ang. *NF-kappa-B essential modulator*, niezbędny modulator NF-κB
- NF-κB** ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*,
czynnik jądrowy κB
- NIK** ang. *NF-kappa-B inducing kinase*, kinaza indukująca NF-κB
- NOD** ang. *nucleotide-binding oligomerization domain containing*,
białko zawierające domenę wiązania i oligomeryzacji nukleotydów
- p38** kinaza białkowa p38 aktywowana mitogenami
- PAMP** ang. *pathogen-associated molecular patterns*,
wzorce molekularne związane z patogenami
- polyI:C** kwas poliinozynowo-policytydylowy
- PRR** ang. *pathogen recognition receptor*, receptor rozpoznający wzorce
- pz** para zasad
- RIG-I** ang. *retinoic acid-inducible gene 1*,
gen indukowany kwasem retinowym; receptor z rodziny RLR
- RING** ang. *really interesting new gene*, domena katalityczna ligazy ubikwityny
- RIP** ang. *receptor-interacting protein*, kinaza białkowa oddziałująca z receptorem
- RLR** ang. *RIG-I like receptor*, receptor RIG-I-podobny
- RNA** kwas rybonukleinowy
- TAK1** ang. *transforming growth factor beta-activated kinase 1*,
kinaza 1 aktywowana TGF-β
- TANK** ang. *TRAF family member-associated NF-κB activator*,
aktywator NF-κB związany z rodziną TRAF

- TBK1** ang. *TANK-binding kinase 1*, kinaza 1 wiążąca TANK
- TGF** ang. *transforming growth factor*, transformujący czynnik wzrostu
- TIR** ang. *Toll-interleukin 1 receptor (TIR) homology domain*,
domena homologii Toll receptora dla interleukiny 1
- TIRAP** ang. *TIR domain-containing adapter protein*,
białko adaptorowe posiadające domenę TIR
- TLR** ang. *Toll-like receptor*, receptor Toll-podobny
- TNF** ang. *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworu
- TNFR** ang. *TNF receptor*, receptor czynnika martwicy nowotworu
- TRAF** ang. *TNF-receptor-associated factor*, czynnik związany z receptorem TNF
- TRAM** ang. *TRIF-related adapter molecule*, cząsteczka adaptorowa powiązana z TRIF
- TRIF** ang. *TIR-domain containing adapter-inducing interferon- β* , białko adaptorowe
posiadające domenę TIR indukujące interferon β
- U2 OS** ang. *human bone osteosarcoma epithelial cells*,
ludzka linia komórkowa kostniakomięsaka
- VSV** ang. *vesicular stomatitis Indiana virus*,
wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej szczepu Indiana

4. Wstęp

4.1. Wprowadzenie

Organizmy żywe stykają się codziennie z milionami potencjalnych patogenów. Najstarszą formą obrony przed nimi jest odpowiedź wrodzona, która w najprostszej postaci występuje u organizmów prokariotycznych wykorzystujących w pierwszej linii obrony enzymy restrykcyjne, osiągając najbardziej zaawansowaną formę u kręgowców. Niezależnie od organizmu, punktem krytycznym odpowiedzi nieswoistej jest rozróżnienie cząsteczek „swoich” od „nieswoich” (ang. *self/nonself discrimination*). U kręgowców odpowiedzialne za ten proces są, opisane w 1989 roku przez Charlesa Janeway, receptory rozpoznające wzorce (PRRs, ang. *pattern recognition receptors*), które wiążą wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP, ang. *pathogen associated molecular patterns*) (1). Wzorce PAMP stanowią ewolucyjnie konserwatywne struktury występujące u patogenów takich jak wirusy, bakterie czy grzyby.

Wirusy zawierają w swojej strukturze zróżnicowane wzorce molekularne, takie jak glikoproteiny powierzchniowe czy wirusowe DNA lub RNA powstające podczas replikacji wirusa (2). Do bakteryjnych wzorców PAMP zaliczają się składniki ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, takie jak kwas lipotejchowy, lipoproteiny i peptydoglikany. Lipopolisacharydy, będące składnikami błon bakterii Gram-ujemnych, stanowią jeden z najsilniejszych wzorców PAMP i odpowiedzialne są za silną odpowiedź zapalną podczas wstrząsu septycznego. Do ważnych komponentów bakteryjnych rozpoznawanych przez komórki eukariotyczne należą również flagellina, będąca ważnym białkiem strukturalnym, oraz niemetylowane sekwencje CpG-DNA (3).

Receptory PRR oprócz rozpoznawania obcych cząsteczek mają również zdolność wiązania struktur molekularnych związanych z uszkodzeniem (DAMP, ang. *damage-associated molecular patterns*), które stanowią endogenne cząsteczki powstałe w wyniku uszkodzenia lub śmierci komórek. Mogą być one również cząsteczkami, które z powodu nieprawidłowego działania maszyneryi komórkowej zmieniły swoją lokalizację (4). Zaliczyć do nich można niehistonowe białko chromosomalne (HMBG1, ang. *high mobility group box protein 1*), białka szoku cieplnego, histony, nukleofosminę czy endogenne DNA, które znalazło się poza jądrem komórkowym (5).

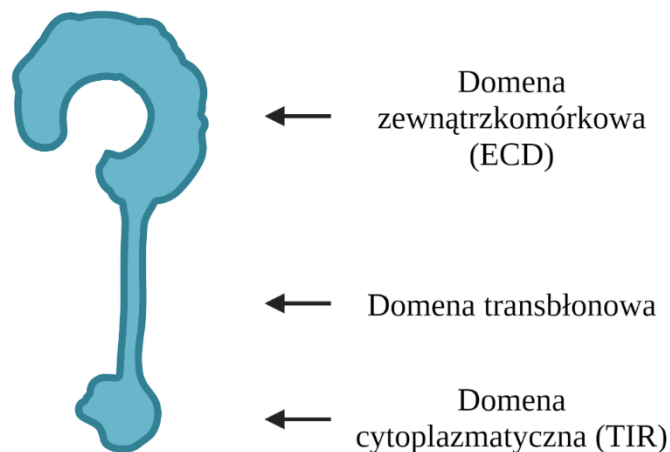
Receptory rozpoznające wzorce są klasą receptorów, które bezpośrednio rozpoznają specyficzne struktury molekularne na powierzchni patogenów, komórek apoptotycznych czy starzejących się komórek gospodarza. Poprzez rozpoznawanie i wiązanie ligandów odpowiedzialne są za wytwarzanie nieswoistej przeciwwirusowej, przeciwbakteryjnej czy przeciwnowotworowej odpowiedzi komórkowej. Większość receptorów PRR u kręgowców można sklasyfikować na podstawie homologii domen białkowych dzieląc je na pięć grup: receptory Toll-podobne (TLR, ang. *Toll-like receptors*), receptory NOD-podobne (NLR, ang. *NOD-like receptors*), receptory RIG-I-podobne (RLR, ang. *RIG-I like receptors*), receptory lektynowe typu C (CLR, ang. *C-type lectin receptors*) oraz receptory AIM-2-podobne (ALR, ang. *AIM2-like receptors*) (6).

Punktem krytycznym odpowiedzi gospodarza na zakażenie wirusowe jest aktywacja receptorów rozpoznających wirusowe DNA i RNA, co prowadzi do produkcji interferonów (IFN) typu I oraz cytokin prozapalnych. Odpowiedzialne za tę odpowiedź są głównie receptory Toll-podobne, lokalizujące się na błonie komórkowej i w endosomach, oraz cytozolowe receptory RLR (7, 8).

4.2. Receptory Toll-podobne

Odkrycie receptorów Toll-podobnych było rewolucyjnym wydarzeniem w świecie immunologii. Bruce Beutler oraz Jules Hoffman zostali w 2011 roku nagrodzeni nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za pracę z 1996 roku dotyczącą receptorów TLR jako kluczowych komponentów układu immunologicznego odpowiedzialnych za rozpoznawanie patogenów (9, 10). Rodzina receptorów Toll-podobnych zawiera 13 białek, z czego u człowieka występuje 10 z nich (TLR 1-10), natomiast u myszy 12 (TLR 1-9 i 11-13) (11).

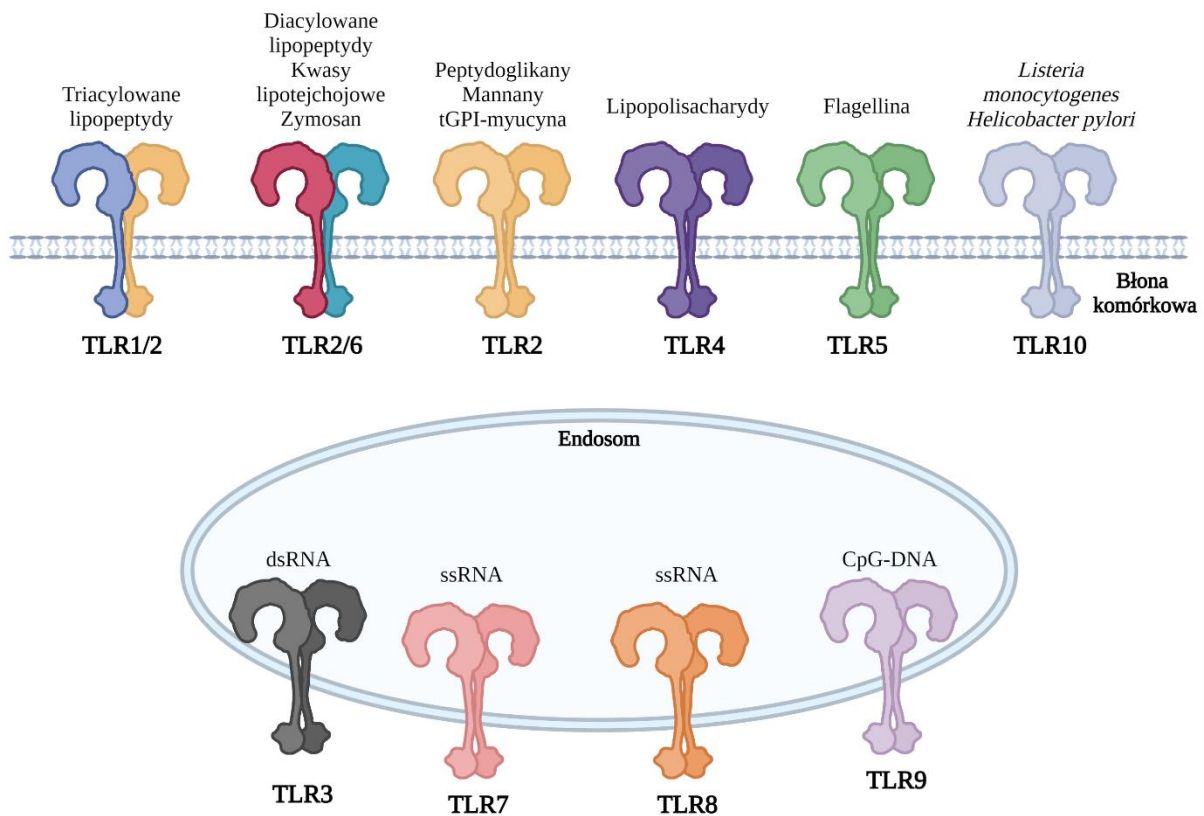
Receptory z rodziny TLR cechują się podobną organizacją domen. Wszystkie są białkami transbłonowymi typu I, składającymi się z trzech charakterystycznych domen: N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej (ECD, ang. *extracellular domain*), domeny transbłonowej oraz domeny cytoplazmatycznej TIR (ang. *Toll-interleukin 1 receptor*) (Rys. 4.1). Domena zewnątrzkomórkowa posiada moduły powtórzeń leucynowych (LLR, ang. *leucine-rich repeats*) i odpowiedzialna jest za rozpoznawanie ligandów. Podstawowy moduł LLR składa się z 24 aminokwasów, które tworzą β -kartki oraz α -helisy połączone pętlą. Po rozpoznaniu liganda przez domenę ECD, domena TIR dimeryzuje w cytoplazmie, tworząc rusztowanie konieczne do wiązania białek adaptorowych i aktywacji ścieżek sygnałowych (12).



Rysunek 4.1 Schemat budowy receptorów TLR

Receptory z rodziny TLR ekspresjonowane są przez komórki immunologiczne takie jak komórki dendrytyczne oraz makrofagi, ale również przez komórki nabłonkowe czy fibroblasty. Klasyfikacja receptorów TLR opiera się na ich lokalizacji komórkowej. Wyróżnia się wśród nich błonowe receptory TLR oraz wewnątrzkomórkowe receptory TLR. Do receptorów błonowych zalicza się TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR11, TLR6 oraz TLR10. Receptory z tej podrodziny odpowiedzialne są za rozpoznawanie mikrobiologicznych komponentów

błonowych, takich jak lipidy, lipoproteiny i białka (Rys. 4.2). Wewnątrzkomórkowe receptory TLR odpowiedzialne są natomiast za rozpoznawanie kwasów nukleinowych pochodzących z bakterii i wirusów oraz rozpoznawanie kwasów nukleinowych gospodarza w stanach patologicznych. Do grupy tej należą receptory: TLR3, TLR7, TLR8 oraz TLR9 (12, 13).



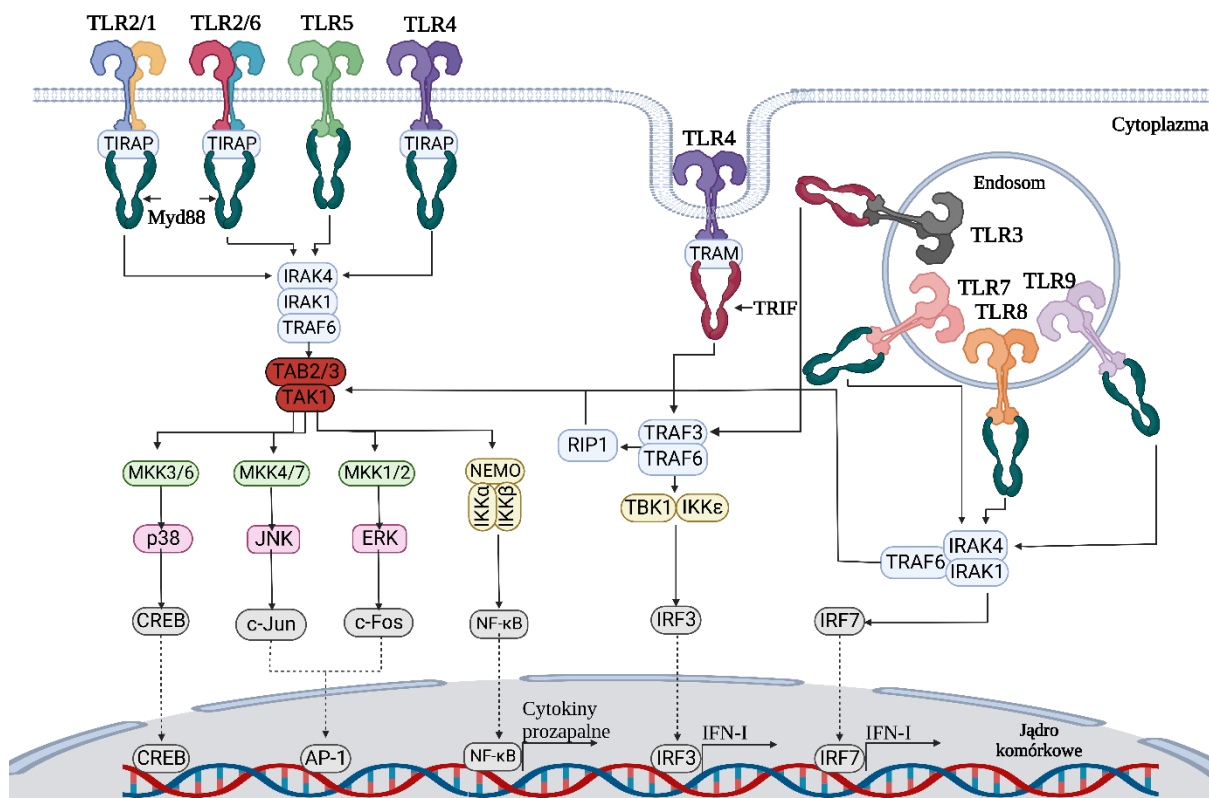
Rysunek 4.2 Ligandy ludzkich receptorów TLR (12)

Zwiążanie specyficznego liganda przez receptor TLR prowadzi do dimeryzacji domeny zewnątrzkomórkowej, co z kolei prowadzi do dimeryzacji cytozolowej domeny TIR. Dimery tworzone przez domeny TIR receptorów TLR1/2, TLR2/6, TLR4 i TLR5 są następnie rozpoznawane przez białko adaptorowe zawierające domenę TIR (TIRAP, ang. *TIR domain-containing adapter protein*), znane również pod nazwą Mal. Dimeryzacja receptora TLR4 może prowadzić również do rekrutacji białka adaptorowego TRAM (ang. *TRIF-related adapter molecule*). Białka TIRAP i TRAM następnie rekrutują odpowiednio MyD88 (ang. *myeloid differentiation primary response protein 88*) oraz TRIF (ang. *TIR-domain containing adapter-inducing interferon- β*), stymulując tworzenie rusztowania umożliwiającego tworzenie większych kompleksów białkowych, zwanych „Myddosome” oraz „Trifosome”. Składają się one z komponentów sygnałowych inicjujących kaskadę sygnałową w cytozolu. W zależności od tego jakie kompleksy zostaną uformowane, ścieżki sygnałowe zależne od receptorów TLR mogą być sklasyfikowane jako ścieżki MyD88-zależne oraz ścieżki TRIF-zależne (13). Wszystkie receptory TLR, z wyjątkiem TLR3, wykorzystują MyD88 jako białko adaptorowe. U ssaków TLR9, TLR11, TLR13, TLR7/8 oraz TLR2/10 rekrutują białko MyD88 bezpośrednio, podczas gdy TLR4, TLR5, TLR1/TLR2 oraz TLR2/TLR6 do rekrutacji MyD88

wykorzystują białko Mal. W podobny sposób, TRIF rekrutowany jest bezpośrednio przez receptor TLR3 (14) (Rys. 4.3).

W ścieżce MyD88-zależnej, MyD88 tworzy kompleks z białkami z rodziny kinaz związanych z receptorem interleukiny 1 (IRAK, ang. *interleukin-1 receptor associated kinase*). IRAK4 aktywuje IRAK1, który ulega autofosforylacji, w wyniku czego zostaje odłączony od MyD88. IRAK1 oddziałuje następnie z TRAF6 (ang. *TNF receptor associated factor 6*). TRAF6 wspólnie z enzymami koniugującymi ubikwitynę – UBC13 oraz UEV1A, promuje K63-zależną ubikwitynację TRAF6 oraz kompleksu kinaz TAK1 (ang. *transforming growth factor- β -activated kinase 1*). TAK1 następnie aktywuje dwie ścieżki sygnałowe: ścieżkę sygnałową NF- κ B oraz ścieżkę MAPK (kinaz aktywowanych mitogenami, ang. *mitogen-activated protein kinases*). W pierwszej ze ścieżek aktywacja TAK1 prowadzi do aktywacji kinaz z rodziny MAP, takich jak ERK 1/2, p38 oraz JNK, które pośredniczą w aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny AP-1 (ang. *activator protein 1*) i regulacji odpowiedzi prozapalnej. Druga kaskada obejmuje aktywację kompleksu IKK, który składa się z podjednostek katalitycznych IKK α i IKK β oraz podjednostki regulatorowej NEMO (nazywanej również IKK γ). TAK1 wiąże się z kompleksem IKK poprzez łańcuchy ubikwityny, co prowadzi do fosforylacji i aktywacji IKK β . Następnie kompleks IKK fosforyluje podjednostkę inhibitorową NF- κ B – I κ B α , prowadząc do jej proteasomalnej degradacji, co pozwala na translokację podjednostek NF- κ B do jądra komórkowego i indukcję ekspresji cytokin prozapalnych (15, 16). Ścieżka MyD88-zależna wymagana jest do aktywacji NF- κ B oraz p38 w ścieżkach sygnałowych zależnych od receptorów TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 oraz TLR9. Aktywacja ścieżek sygnałowych zależnych od TLR9 oraz TLR7/8 prowadzi do produkcji interferonów typu I poprzez aktywację IRF7 (14).

W komórkach takich jak makrofagi oraz komórki dendrytyczne, aktywacja receptorów TLR3 oraz TLR4 aktywuje ścieżkę TRIF-zależną. Detekcja dimeru TLR4 w endosomie prowadzi do oddziaływania TRAM z białkiem TRIF, indukując formowanie Trifosomu, gdzie TRIF oddziałuje z TRAF6 oraz TRAF3 (ang. *TNF receptor associated factor 3*). Zaktywowany TRAF6 rekrutuje następnie kinazę RIP1 (ang. *kinase receptor-interacting protein 1*), co w konsekwencji prowadzi do rekrutacji i aktywacji kompleksów TAK1 oraz IKK, skutkując aktywacją ścieżek NF- κ B oraz kinaz MAP i produkcją cytokin prozapalnych. TRAF3 odpowiedzialne jest za aktywację kinaz związanych z IKK - TBK1 (ang. *TANK-binding kinase 1*) oraz IKK ϵ oraz podjednostki regulatorowej NEMO, co prowadzi do fosforylacji i dimeryzacji czynnika IRF3 (ang. *interferon regulatory factor 3*). IRF3 następnie ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie napędza ekspresję IFN typu I (11).



Rysunek 4.3 Schemat szlaków sygnałowych receptorów TLR (13)

Najważniejszymi receptorami z rodziny receptorów Toll-podobnych z punktu widzenia infekcji wirusowych są receptory TLR3, TLR7/8 oraz TLR9 odpowiedzialne za wykrywanie wirusowych kwasów nukleinowych w endosomie. Ponadto receptor TLR2 bierze udział w rozpoznawaniu glikoprotein otoczki cytomegalowirusa (CMV) oraz koronawirusa SARS-CoV-2. Wykazano również jego istotną rolę w rozpoznawaniu wirusa krowianki, wirusa Ebsteina-Barr, wirusa opryszczki zwykłej (HSV), wirusa ospy wietrznej, wirusa zapalenia wątroby typu C oraz wirusa odry (17, 18).

4.2.1. TLR3

Receptor TLR3 ekspresjonowany jest przez komórki układu nerwowego, fibroblasty, komórki nabłonka oraz komórki immunologiczne, takie jak komórki dendrytyczne i makrofagi. Receptor ten umiejscowiony jest głównie w błonie endosomów lub na powierzchni komórek dendrytycznych i makrofagów (19). TLR3 odpowiedzialny jest za rozpoznawanie wirusowego dwuniciowego RNA (dsRNA), małego interferującego RNA oraz uszkodzonego RNA gospodarza (11).

TLR3 rozpoznaje dsRNA poprzez swoją ektodomenę (ECD), która składa się z 23 powtórzeń bogatych w leucynę (LLRs) oraz N- i C-końcowych regionów flankujących. Domena ECD wiąże dsRNA od długości 40-50 par zasad (pz), a dimery tworzone przez te domeny mogą wiązać dłuższe fragmenty dsRNA. Wykazano, że zdolność wiązania wzrasta wraz ze zmniejszającym się pH oraz długością dsRNA, dzięki czemu w wysokim pH (6-6,5)

wczesnego endosomu wiązane są fragmenty o długości powyżej 90 pz, a w późnym endosomie, gdzie pH wynosi poniżej 5,5 możliwe jest wiązanie dsRNA o długości 40-50 pz (20).

W stanie nieaktywnym domena cytoplazmatyczna TLR3 pozostaje w zamkniętej konformacji, która blokuje niepożądaną aktywację receptora. Związanie dsRNA w świetle endosomu poprzez ektodomenę TLR3 powoduje jego dimeryzację. Dimeryzacja prowadzi do zmian konformacyjnych w domenie cytoplazmatycznej, co pozwala na rekrutację specyficznych kinaz tyrozynowych: EGFR oraz Src, które odpowiedzialne są za fosforylację odpowiednio reszt Tyr858 oraz Tyr759 występujących w domenie TIR (21). Fosforylacja jest konieczna do rekrutacji białka adaptorowego TRIF i aktywacji kolejnych kaskad sygnałowych. TLR3 jako jedyny endosomalny receptor Toll-podobny wymaga fosforylacji kinaz. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tego zjawiska jest to, że kaskady sygnałowe aktywowane przez pozostałe receptory endosomalne (TLR 7-9) indukowane są na drodze MyD88-zależnej (22). Rekrutacja TRIF, wywołana dimeryzacją receptora TLR3 oraz fosforylacja odpowiednich reszt tyrozynowych, powoduje stymulację czynników transkrypcyjnych IRF3, NF- κ B oraz AP-1 poprzez aktywację dwóch kaskad sygnałowych. W jednej ze ścieżek białko 1 powiązane z kinazą aktywująca NF- κ B (NAP1, ang. *NF- κ B activating kinase-associated protein 1*) pośredniczy w wiązaniu białka adaptorowego TRIF z TRAF3 oraz kinazą TBK1 oraz IKK ϵ , co promuje fosforylację, dimeryzację oraz translokację IRF3 do jądra komórkowego (23). W drugiej ścieżce, prowadzącej do aktywacji NF- κ B oraz AP-1, pośredniczy kinaza RIP1 oraz TRAF6, które oddziałują z białkiem adaptorowym TRIF. Prowadzi to do rekrutacji białek TAB2 (ang. *TAK1 binding protein 1*), TAB3 (ang. *TAK1 binding protein 3*) oraz TAK1. Ścieżka ta prowadzi do aktywacji kompleksu IKK oraz MAPK, a w konsekwencji do aktywacji NF- κ B oraz AP-1. Aktywacja obu ścieżek prowadzi do produkcji interferonów typu I, cytokin prozapalnych oraz chemokin (24).

Dwuniciowe RNA może być wytwarzane jako produkt pośredni podczas replikacji wirusów RNA i DNA, a niektóre z wirusów posiadają genom złożony z dsRNA. Ze względu na to szlaki sygnałowe aktywowane przez receptor TLR3 odpowiedzialne są za kontrolę większości istotnych klinicznie infekcji wirusowych wywoływanych przez flawiwirusy, wirusy zapalenia wątroby typu B i C, herpeswirusy, rotawirusy, retrowirusy, ortomyksowirusy czy pokswirusy (22).

4.2.2. TLR7

Ekspresja receptora TLR7 jest zróżnicowana w różnych typach komórek. Konstitutywna ekspresja dominuje w ludzkich i mysich plazmacytoidalnych komórkach dendrytycznych i limfocytach B. Niski poziom receptora zaobserwowano również w komórkach takich jak hepatocyty, komórki nabłonkowe czy keratynocyty. Ekspresja TLR7 może być indukowana w komórkach, które w stanie niewzbudzonym wykazują niski poziom tego receptora. Wykazano, że stymulacja IFN γ ludzkich makrofagów indukuje ekspresję TLR7, co w konsekwencji skutkuje zwiększoną reaktywnością tego receptora. Ponadto infekcja wirusami takimi jak wirus zapalenia wątroby typu C, wirus niedoboru odporności (HIV) czy wirus

grypy A, powoduje zwiększenie ekspresji TLR7 w hepatocytach, cyrkulujących komórkach odpornościowych oraz pierwotnych makrofagach (25).

Receptor TLR7 jest sensorem jednoniciowego RNA, jednak aktywowany jest także przez guanozynę oraz ligandy chemiczne, takie jak imidazochinolina. W 2016 Zhang wraz z zespołem dowiedli, że receptor TLR7 posiada dwa miejsca wiążące. Pierwsze miejsce wiąże ssRNA bogate w powtórzenia guanozyny, podczas gdy drugie miejsce wiąże ssRNA bogate w powtórzenia urydyny. Związywanie ssRNA w drugim miejscu wiążącym promuje jego oddziaływanie z resztami guanozyny związanymi w pierwszym miejscu, co skutkuje dimeryzacją receptora. Wykazano jednak, że ligandy chemiczne zdolne są do indukcji dimeryzacji po związaniu tylko w pierwszym miejscu wiążącym receptora (26).

W stanie nieaktywnym TLR7 rezyduje w retikulum endoplazmatycznym i dopiero po wzbudzeniu transportowany jest do endosomu. W procesie tym pośredniczy białko Unc93B1. Niskie pH endosomu indukuje proteolityczne cięcie receptora z udziałem endopeptydaz asparaginowych oraz wielu katepsyn, co umożliwia jego pełną aktywację (27). Zaktywowany receptor TLR7 oddziałuje przez domenę TIR z białkiem adaptorowym MyD88, co prowadzi do aktywacji kinaz MAP, NF- κ B oraz IRF7 i IRF5 na drodze zależnej od kinaz IRAK1/4 oraz TRAF3/6. Pobudzenie tych ścieżek prowadzi w konsekwencji do produkcji cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 oraz IFN α (11, 25).

Dysregulacja TLR7 może prowadzić do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych oraz autoimmunologicznych. Wykazano, że pacjenci chorzy na toczeń rumieniowaty układowy wykazują fenotyp wskazujący na zwiększoną aktywację TLR7 (28). Stwierdzono również, że nadreaktywność TLR7 przyczynia się do zaostrzenia łuszczycy (29).

4.2.3. TLR8

Receptor TLR8 ekspresjonowany jest przez komórki takie jak monocyty, makrofagi, neutrofile, mieloidalne komórki dendrytyczne oraz komórki T regulatorowe, gdzie podobnie jak TLR7 odpowiedzialny jest za rozpoznawanie ssRNA (30). TLR7 i TLR8 wykazują wysoki stopień homologii oraz podobieństwa w strukturze trójwymiarowej. Różnią się one jednak pod względem pełnionych funkcji oraz dystrybucji w komórkach. Jak wspomniano wcześniej TLR7 jest ekspresjonowany głównie w plazmacytoidalnych komórkach dendrytycznych oraz limfocytach B i odpowiedzialny jest za rozpoznawanie ssRNA bogatego w reszty guanozyny, podczas gdy TLR8 pełni rolę receptora rozpoznającego ssRNA bogatego w reszty urydyny (31).

Ektodomena receptora TLR8 zawiera 26 powtórzeń bogatych w leucynę, co jest największą liczbą LLR spośród wszystkich receptorów Toll-podobnych. Badania struktury TLR8 wykazały, że pomiędzy LLR14 a LLR15 znajduje się długi region insertu, około 40 aminokwasów, nazwany pętlą Z (32). Zaobserwowano również, że ektodomena występuje w formie przeciętej w miejscu pętli Z, jednak pomimo tego *N*-koniec (reszty 27-455) oraz *C*-koniec (reszty 456-827) oddziałują ze sobą (33). Proteolityczne cięcie w miejscu pętli Z receptora TLR8, katalizowane przez furynopodobną konwertazę proproteinową i katepsynę, umożliwia aktywację receptora, związanie liganda oraz indukcję kaskad sygnałowych

w endolizosomie (34). Receptor TLR8 występuje w formie dimeru zarówno przed jak i po związaniu liganda. Po związaniu liganda, dimer ulega zmianom konformacyjnym, umożliwiając dimeryzację domen TIR oraz rekrutację białka adaptorowego MyD88 (33).

W 2015 roku Hiromi Tanji wraz z zespołem opublikował pracę, w której udowadniają, że TLR8 podobnie jak TLR7 posiada dwa miejsca wiążące ligand. Jedno z miejsc rozpoznaje reszty urydyny, natomiast drugie miejsce wiążące odpowiedzialne jest za rozpoznawanie krótkich oligonukleotydów ssRNA (35). Zaktywowany receptor TLR8 oddziałuje przez domenę TIR z białkiem adaptorowym MyD88, co prowadzi do aktywacji IRF7, AP-1 oraz NF- κ B na drodze zależnej od TRAF6. Indukuje to ekspresję interferonów typu I oraz cytokin prozapalnych, takich jak IL1- α/β , IL-6, IL-8, IL-12 β , IL-27, czy TNF- α (30). Co ciekawe, mysi receptor TLR8 nie rozpoznaje ligandów ssRNA, wirusów RNA czy niskocząsteczkowych agonistów ludzkiego receptora TLR8. Wynika to z braku pięciu kluczowych aminokwasów koniecznych do rozpoznawania RNA przez ludzki receptor (36).

Receptor TLR8 pełni istotną rolę w odpowiedzi przeciwwirusowej indukowanej wirusami takimi jak wirus krowianki, wirus grypy typu A, wirus Coxsackie B, HIV, wirus gorączki Zachodniego Nilu czy wirus Zika (30). Liczne badania wskazują również na istotną rolę TLR8 w chorobach autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, zespół antyfosfolipidowy, czy nieswoiste zapalenie jelit. Ze względu na brak odpowiednich modeli zwierzęcych badania te ograniczają się głównie do badań polimorfizmu genu (37).

4.2.4. TLR9

TLR9 jest receptorem rozpoznającym DNA, ekspresjonowanym głównie w komórkach dendrytycznych oraz makrofagach. Preferencyjnie wiąże się on do heksamerów zawierających niemetylowane dinukleotydy cytozyno-guaninowe (CpG) pochodzenia bakteryjnego oraz wirusowego (38). W 2018 roku Umeharu Ohto wraz z zespołem dowiedli, że TLR9 posiada drugie miejsce wiążące, które rozpoznaje sekwencje DNA zawierające cytozynę na drugim miejscu od końca 5' (5'-xCx DNA). 5'-xCx DNA wiąże się do receptora w obecności CpG DNA wspólnie promując dimeryzację i aktywację receptora (39). Rozpoznawanie DNA przez TLR9 odbywa się w przedziale endosomalnym. Podobnie jak TLR7 oraz TLR8, receptor TLR9 wymaga cięcia proteolitycznego do swojej pełnej aktywacji. TLR9 ulega cięciu pomiędzy 14, a 15 regionem LLR przez endopeptydazę asparaginową oraz katepsyny. Przecięta ektodomena TLR9 występuje w postaci monomeru, a dopiero związanie DNA indukuje dimeryzację receptora (40). Cięcie receptora TLR9 zależne jest od wiązania i transportu z retikulum endoplazmatycznego do endosomu przez białko Unc93B1, które uważane jest za niezbędne do aktywacji tego receptora (41). Co ciekawe, w komórkach takich jak kardiomiocyty czy neurony, białko Unc93B1 nie jest wymagane do aktywacji TLR9, co sugeruje odmienną rolę tego receptora w komórkach nieimmunologicznych. W zaproponowanym przez Yasunori Shintaniego modelu, komórki nieimmunologiczne, charakteryzujące się niską ekspresją Unc93B1, rozpoznają DNA pochodzące z uszkodzonych komórek. W wyniku wykrycia zagrożenia zmniejszają one zużycie energii oraz zwiększają odporność na stres poprzez aktywację ścieżki AMPK (ang. *AMP-activated protein kinase*).

Ponadto aktywacja tej alternatywnej ścieżki TLR9 jest niezależna od białka adaptorowego MyD88 (42). W klasycznej ścieżce domena TIR zaktywowanego receptora TLR9 oddziałuje z białkiem adaptorowym MyD88, inicjując aktywację kinaz IRAK4 oraz IRAK1. W konwencjonalnych komórkach dendrytycznych, kinaza IRAK4 rekrutuje następnie TRAF6, co prowadzi do aktywacji kinazy TAK1 i fosforylacji kompleksu IKK, skutkując aktywacją NF- κ B oraz kinaz MAP, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji kompleksu AP-1 i indukcji ekspresji cytokin prozapalnych takich jak IL-6, IL-12 oraz TNF. Natomiast w plazmacytoidalnych komórkach dendrytycznych aktywacja kompleksu sygnałowego składającego się z IRAK1, IRAK4 oraz TRAF6 prowadzi do fosforylacji czynnika transkrypcyjnego IRF7, co indukuje ekspresję interferonów typu I (43).

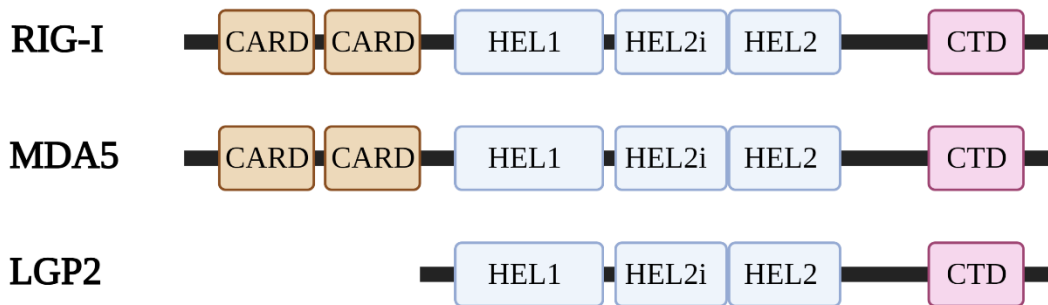
Receptor TLR9 bierze udział w rozpoznawaniu materiału genetycznego wirusów takich jak cytomegalowirusy, wirusy opryszczki czy adenowirusy (38). TLR9 znany jest również jako receptor przyczyniający się do rozwoju chorób autoimmunologicznych, ponieważ jest on zdolny do rozpoznawania endogennego DNA i indukcji procesów zapalnych. Receptor ten został zidentyfikowany jako istotny czynnik chorób takich jak cukrzyca typu I, łuszczyca oraz niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby (41).

4.3. Receptory RIG-I podobne

Receptory RIG-I podobne (RLR) są drugą rodziną sensorów kluczowych w rozpoznawaniu infekcji wirusowych, które pośredniczą w indukcji ekspresji interferonów typu I i innych genów, indukując odpowiedź przeciwwirusową gospodarza. W skład rodziny receptorów RLR wchodzi: receptor RIG-I (ang. *retinoic acid inducible gene*), receptor MDA5 (ang. *melanoma differentiation-associated protein 5*) oraz receptor LGP2 (ang. *laboratory of genetics and physiology 2*) (44). Receptory te zlokalizowane są w cytozolu i odpowiedzialne są za rozpoznawanie egzogenego dwuniciowego RNA, które stanowi wirusowy materiał genetyczny lub produkt powstały podczas replikacji wirusowej (45).

Receptory RIG-I oraz MDA5 ekspresjonowane są przez komórki każdego typu. Ich funkcje zostały jednak najlepiej poznane w komórkach odpornościowych, takich jak makrofagi, neutrofile i komórki dendrytyczne oraz w komórkach nabłonka (46). Oba receptory odpowiedzialne są za wykrywanie szerokiej gamy wirusów i indukcję odpowiedzi przeciwwirusowej. Klasyfikowane są one jako ATP-zależne helikazy RNA z motywem DExD/H i dzielą szereg podobieństw strukturalnych. Na N-końcu posiadają dwie domeny aktywujące i rekrutujące kaspazę (CARD, ang. *caspase activation and recruitment domain*), które odpowiedzialne są za oddziaływanie z białkiem adaptorowym MAVS (ang. *mitochondrial antiviral signaling protein*) (47, 48). Oprócz tandemu domen CARD, występujących tylko w receptorach RIG-I i MDA-5, wszystkie receptory z rodziny RLR zawierają centralny rdzeń złożony z domen helikaz RNA z motywem DExD/H – HEL1 i HEL2 oraz domeny insercyjnej HEL2i. Domeny HEL1 i HEL2 tworzą na swoim styku aktywne miejsce wiązania i hydrolizy ATP, a także współtworzą rozszerzoną powierzchnię wiążącą RNA (49, 50). Ostatnią domeną charakterystyczną dla receptorów z rodziny RLR jest C-końcowa domena (CTD, ang. *C-terminal domain*), zwana domeną represorową (Rys. 4.4).

Każdy z receptorów zawiera dodatkowo naładowane wgłębienie w domenie CTD, które odpowiedzialne jest za rozpoznawanie i wiązanie dsRNA. Wgłębienia te różnią się od siebie w obrębie białek z rodziny RLR co sugeruje, że domena represorowa determinuje różne preferencje tych receptorów w wiązaniu RNA (51).



Rysunek 4.4 Schemat budowy receptorów z rodziny RLR

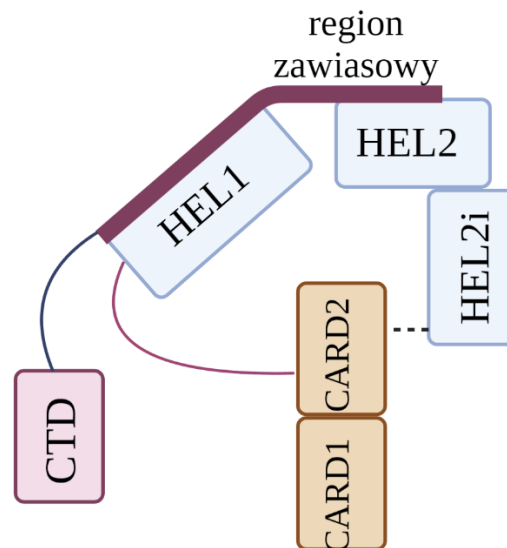
4.3.1. RIG-I

Receptor RIG-I jest białkiem o masie 106 kDa składającym się z 925 aminokwasów o konserwatywnie zachowanej sekwencji wśród kręgowców. Klasyfikowany jest jako ATPaza zależna od dwuniciowego RNA (ang. *double-stranded RNA-dependent ATPase*) (52). Receptor ten jest istotny w rozpoznawaniu wirusów takich jak wirus Sendai, wirusy grypy typu A i B (IAV, IBV), wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej, wirus odry, wirus rzekomego pomoru drobiu, wirus Ebola, wirus Dengi, czy wirus zapalenia wątroby typu C. Wykazano, że występujące w genomach tych wirusów krótkie dwuniciowe RNA z motywem trifosforanowym (ppp) na końcu 5' jest kluczowym wzorcem rozpoznawanym przez receptor RIG-I (53).

Receptor RIG-I rozpoznaje ligandy, które posiadają pewne cechy charakterystyczne pod względem sekwencji, długości, struktury czy obecności reszt fosforanowych na końcu 5'. Idealnym ligandem jest dwuniciowe RNA o długości poniżej 300 par zasad, posiadające tępe końce oraz ugrupowanie trifosforanowe na końcu 5' (5'ppp). Minimalna długość rozpoznawanego RNA wynosi 10 par zasad (54). Wykazano, że receptor RIG-I zdolny jest również do wiązania RNA zawierającego ugrupowania difosforanowe na końcu 5' (5'pp) z podobnym powinowactwem do 5'ppp-RNA (55). Ugrupowania trifosforanowe, występujące licznie w wirusowym materiale genetycznym, spotykane są również w cytozolowym endogennym RNA, dlatego odróżnienie wirusowego od endogennego RNA jest utrudnione. Dodatkową cechą, która pomaga odróżnić obce RNA, jest brak metylacji grupy 2-O pierwszego nukleotydu w wirusowej cząsteczce RNA (56). Ponadto wykazano że aktywność hydrolazy ATP receptora RIG-I stanowi dodatkowy system zapobiegający jego aktywacji przez endogenne cząsteczki RNA. Hydroliza ATP umożliwia translokację receptora wzdłuż cząsteczki RNA, odsłaniając 5'ppp koniec, co umożliwi przyłączenie kolejnej cząsteczki

receptora i jego multimeryzację. Zaobserwowano jednak, że hydroliza ATP powoduje oddysocjowanie endogennego RNA szybciej niż cząsteczki zawierającej 5'ppp-RNA, co uniemożliwia tworzenie oligomerów RIG-I i dalsze przekazywanie sygnału (57).

Wyjątkową cechą tego receptora jest występowanie spiralnej struktury wychodzącej z domeny Hel2, nazwanej regionem zawiasowym. Region ten obejmuje długą α -helisę, która łączy się z Hel1 i zginając się prowadzi do drugiej helisy łączącej się z CTD (52). Przed związaniem liganda, RIG-I występuje w elastycznej konformacji, wykazując niskie powinowactwo do ATP i RNA. W tym stanie domena CARD2 oddziałuje z insercyjną domeną HEL2i poprzez mostki solne i oddziaływania hydrofobowe, utrzymując receptor w stanie autorepresji. Domena CTD natomiast jest elastycznie połączona z domeną helikazy, co czyni ją dostępną do wykrywania i wychwytywania dsRNA z wysokim powinowactwem (Rys. 4.5).



Rysunek 4.5 Schemat nieaktywnej formy receptora RIG-I (52)

Wiązanie dsRNA do domeny CTD przyczynia się do zmian konformacyjnych, co wymusza uwolnienie domen CARD2 (50). Dzięki temu domeny CARD stają się dostępne dla ligazy ubiquityny E3 TRIM25 (ang. *tripartite motif-containing 25*), która katalizuje poliubikwitynację na reszcie lizyny 172. Tworzone łańcuchy poliubikwityny zawierają rozgałęzienia w miejscach lizyny 63 (K63). Ligaza TRIM25 może również tworzyć niezakotwiczone łańcuchy poliubikwityny rozgałęzione w miejscach K63, które niekwalencyjnie oddziałują z receptorem RIG-I. Utworzone w ten sposób łańcuchy poliubikwityny promują formowanie tetrameru domen CARD (58). To z kolei indukuje multimeryzację RIG-I, która promuje oddziaływanie domen CARD receptora RIG-I oraz białka adaptorowego MAVS. Zdarzenia te indukują ścieżki sygnałowe prowadzące do ekspresji i wydzielania IFN β (50).

Wykazano, że mutacje w genie *DDX58*, kodującym RIG-I, powodujące nieprawidłową aktywność hydrolazy ATP mogą być przyczyną chorób autoimmunologicznych takich jak dysplazja Singletona-Mertena (59).

4.3.2. MDA5

Receptor MDA5 został opisany po raz pierwszy w 2002 roku jako białko pełniące rolę helikazy w komórkach mysich i ludzkich. Początkowo uważano, że receptor ten jest zaangażowany w proces apoptozy (60). Badania przeprowadzone w późniejszych latach wykazały jednak, że receptor ten odpowiedzialny jest za rozpoznawanie paramyksowirusów oraz polyI:C (ang. *polyriboinosinic:polyribocytidylic acid*), indukując wydzielanie interferonów typu I (61). MDA5 pełni również istotną rolę w rozpoznawaniu zakażeń powodowanych przez pikornawirusy oraz wirusa SARS-CoV-2 w komórkach nabłonka płuc promując produkcję interferonów typu I (62, 63). Ponadto receptory MDA5 i RIG-I zaangażowane są wspólnie w rozpoznawanie wirusów takich jak wirus Dengi, wirus gorączki Zachodniego Nilu oraz reowirusy (47).

Receptor MDA5 aktywowany jest przez długie dwuniciowe cząsteczki RNA, powstające podczas infekcji wirusami, których genom stanowi pojedyncze, dodatnio spolaryzowane RNA lub DNA. Ponadto złożone i rozgałęzione struktury zwiększają potencjał stymulacyjny dsRNA (64).

Receptor MDA5 charakteryzuje się budową podobną do receptora RIG-I. Składa się on z tandemu domen CARD, centralnej domeny helikazy z motywem DExD/H oraz C-końcowej domeny, która różni się orientacją w stosunku do domeny CTD receptora RIG-I. W przypadku receptora RIG-I domena CTD jest skierowana ku końcowi dsRNA, umożliwiając rozpoznanie 5'ppp i tępego końca dsRNA, podczas gdy domena CTD receptora MDA5 skierowana jest równoległe do osi dsRNA, umożliwiając przemieszczanie dsRNA wzdłuż całej struktury receptora (65). Dodatkowo domena helikazy również przyczynia się do rozpoznawania dsRNA. Wykazano, że receptory MDA5 tworzą filamentowe oligomery wzdłuż dsRNA. Tworzenie filamentów zapewnia platformę dla oligomeryzacji domen CARD, co umożliwia oddziaływanie i aktywację białka adaptorowego MAVS (66).

Mutacje w obrębie genu *IFIH1*, kodującego MDA5, zostały powiązane z licznymi chorobami autoimmunologicznymi, takimi jak cukrzyca typu I, łuszczyca, reumatoidalne zapalenie stawów, bielactwo nabyte, stwardnienie rozsiane i toczeń rumieniowaty układowy. Dokładny mechanizm odpowiedzialny za rozwój tych chorób nie jest w pełni zrozumiały, ale prawdopodobnie związane jest to z przewlekłą indukcją interferonów typu I, które inicjują lub wzmacniają reakcje autoimmunologiczne (60).

4.3.3. LGP2

Trzeci przedstawiciel z rodziny receptorów RIG-I podobnych – LGP2, cechuje się podobną budową do RIG-I oraz MDA5, z tą różnicą że nie posiada domen CARD ani żadnej innej znanej domeny sygnałowej. W niezainfekowanych komórkach występuje na niskim poziomie, jednak jego poziom zwiększa się w odpowiedzi na zakażenie wirusowe. Receptor ten jest zdolny do rozpoznawania RNA niezależnie od jego długości lub obecności fosforanów na końcu 5' (67). Ze względu na różne doniesienia badaczy, rola LGP2 w odpowiedzi immunologicznej pozostaje kontrowersyjna. Pewnym jest, że receptor ten pełni rolę regulatora odpowiedzi zależnej od pozostałych receptorów RIG-I-podobnych. Wydaje się jednak, że pełni

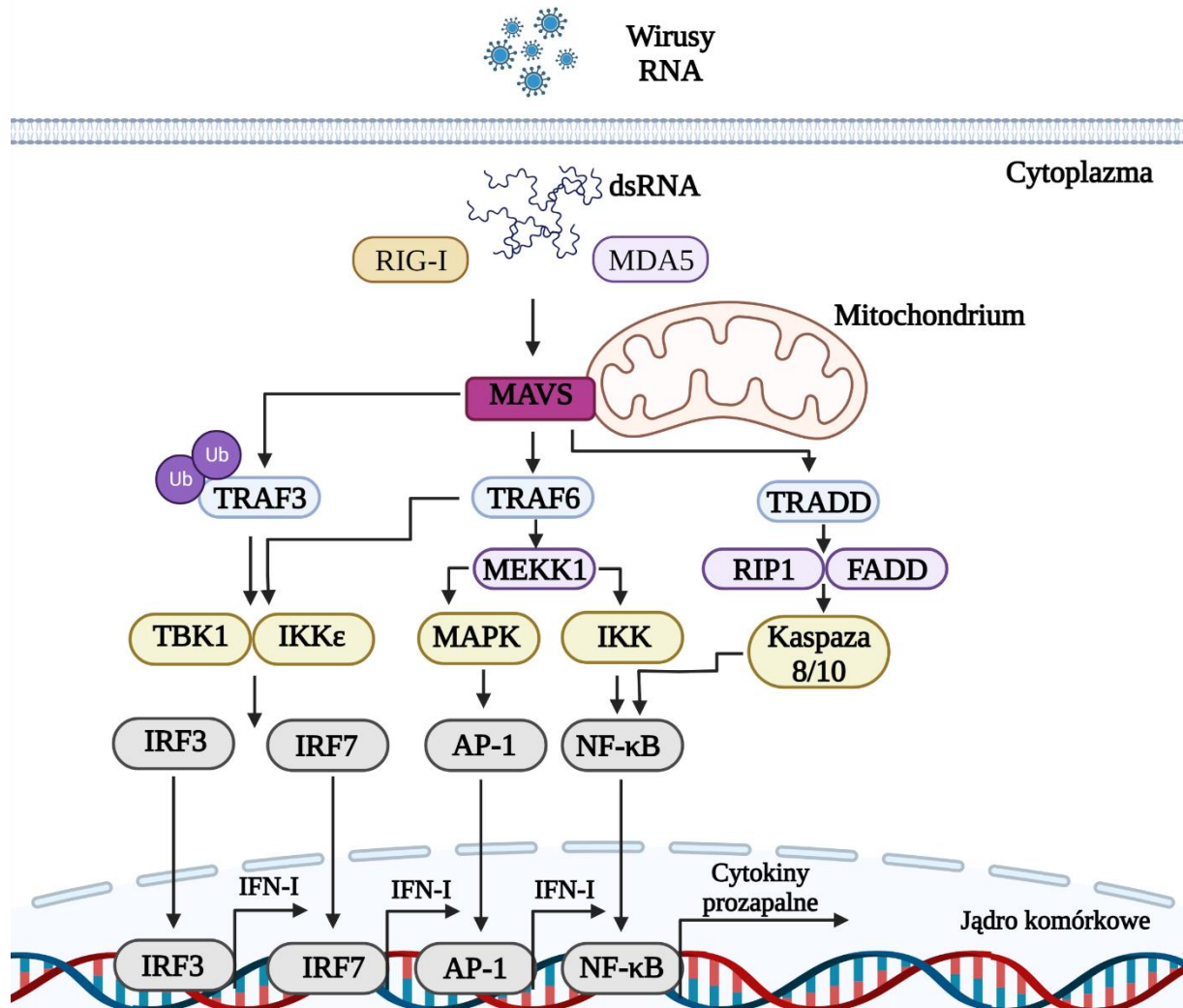
przeciwstawne funkcje podczas aktywacji RIG-I oraz MDA5. Doniesienia literaturowe wskazują na negatywną rolę LGP2 w aktywacji receptora RIG-I. Jeden z proponowanych modeli zakłada, że podczas infekcji wirusowej LGP2 wiąże dwuniciowe RNA, co uniemożliwia jego wiązanie się z receptorem RIG-I, tym samym zapobiegając nadmiernej ekspresji interferonów typu I (68). Inny model zakłada, że LGP2, poprzez swoją domenę represorową, blokuje multimeryzację receptora RIG-I, co uniemożliwia jego interakcję z białkiem adaptorowym MAVS (69). Przeciwnie, receptor LGP2 pełni rolę pozytywnego regulatora w aktywacji receptora MDA5. Jedną z pierwszych obserwacji wskazujących na pozytywną rolę LGP2 w regulacji odpowiedzi przeciwwirusowej zależnej od MDA5 dokonana została przez Venkataramana i współpracowników. Wykazali oni, że myszy z nokautem genu kodującego LGP2 są bardziej podatne na infekcję wirusem zakażenia mózgu i mięśnia sercowego (EMCV) oraz produkują więcej interferonów typu I w odpowiedzi na stymulację polyI:C. (70). Wykazano, że do pozytywnej regulacji odpowiedzi przeciwwirusowej konieczna jest aktywność enzymatyczna LGP2, umożliwiająca hydrolizę ATP (71). Mechanizm odpowiedzialny za regulację aktywności MDA5 przez LGP2 proponowany przez Duica i współpracowników zakłada, że LGP2 pozytywnie wpływa na przyłączanie filamentów MDA5 wzdłuż cząsteczki dsRNA. Badacze wykazali, że cząsteczki LGP2 są wbudowane w utworzone filamety, co sprzyja ich elongacji poprzez zmiany konformacyjne końców ostatnio wbudowanej cząsteczki (67).

4.3.4. Szlaki sygnałowe aktywowane przez receptory RLR

Kluczowym białkiem, koniecznym do przekazywania sygnału po aktywacji receptorów RIG-I podobnych, jest białko adaptorowe MAVS znane również jako IPS-1/VISA/Cardif. To składające się z 540 aminokwasów białko posiada na swoim N-końcu domenę CARD, która oddziałuje z domeną CARD receptorów RIG-I lub MDA5. C-koniec białka MAVS stanowi domena transbłonowa, która lokalizuje go na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Ponadto białko to posiada region bogaty w prolinę, który zawiera trzy miejsca wiążące się z ligazami ubikwityny TRAF, umożliwiając dalsze przekazywanie sygnału (72). Wykazano, że oddziaływanie domen CARD RIG-I i MAVS indukuje tworzenie agregatów MAVS, o cechach podobnych do agregatów tworzonych przez białka prionowe (73).

Agregacja MAVS prowadzi do rekrutacji białek cytozolowych, takich jak ligazy ubikwityny TRAF (Rys. 4.6). Jedną ze ścieżek obejmuje wiązanie białka TRAF3, które ulega autoubikwitynacji, tworząc łańcuchy ubikwityny z rozgałęzieniami w miejscach lizyny K63. Prowadzi to do aktywacji kinaz TBK1 oraz IKK ϵ , które katalizują fosforylację obecnych w cytozolu czynników transkrypcyjnych IRF3 i/lub IRF7. Skutkuje to dimeryzacją czynników IRF3 i/lub IRF7 i ich translokacją do jądra komórkowego, gdzie wiążą się do specyficznych miejsc promotorowych dla interferonów typu I (74, 75). Kolejną ścieżką angażuje ligazę ubikwityny TRAF6, co promuje aktywację kinazy MEKK1 (ang. *MEK kinase 1*). Prowadzi to do aktywacji kinaz IKK oraz MAPK, co aktywuje odpowiednio czynniki transkrypcyjne NF- κ B oraz AP-1, przyczyniając się do indukcji ekspresji cytokin prozapalnych oraz interferonów. Ponadto TRAF6 może również aktywować kinazy TBK1 oraz IKK ϵ , co prowadzi do

fosforylacji czynnika transkrypcyjnego IRF7 indukując ekspresję interferonów (76, 77). Kolejna możliwa ścieżka obejmuje wiązanie MAVS z białkiem TRADD (ang. *tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*), co promuje oddziaływanie TRADD z kinazą RIP1 oraz białkiem FADD (ang. *FAS-associated death domain protein*) poprzez domeny śmierci występujące w tych białkach. Następnie FADD rekrutuje kaspazy 8 i 10, co prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- κ B, indukując ekspresję cytokin prozapalnych (78).



Rysunek 4.6 Szlaki sygnałowe aktywowane przez receptory z rodziny RLR (74, 76, 78)

4.4. Rola interferonu w odpowiedzi przeciwwirusowej

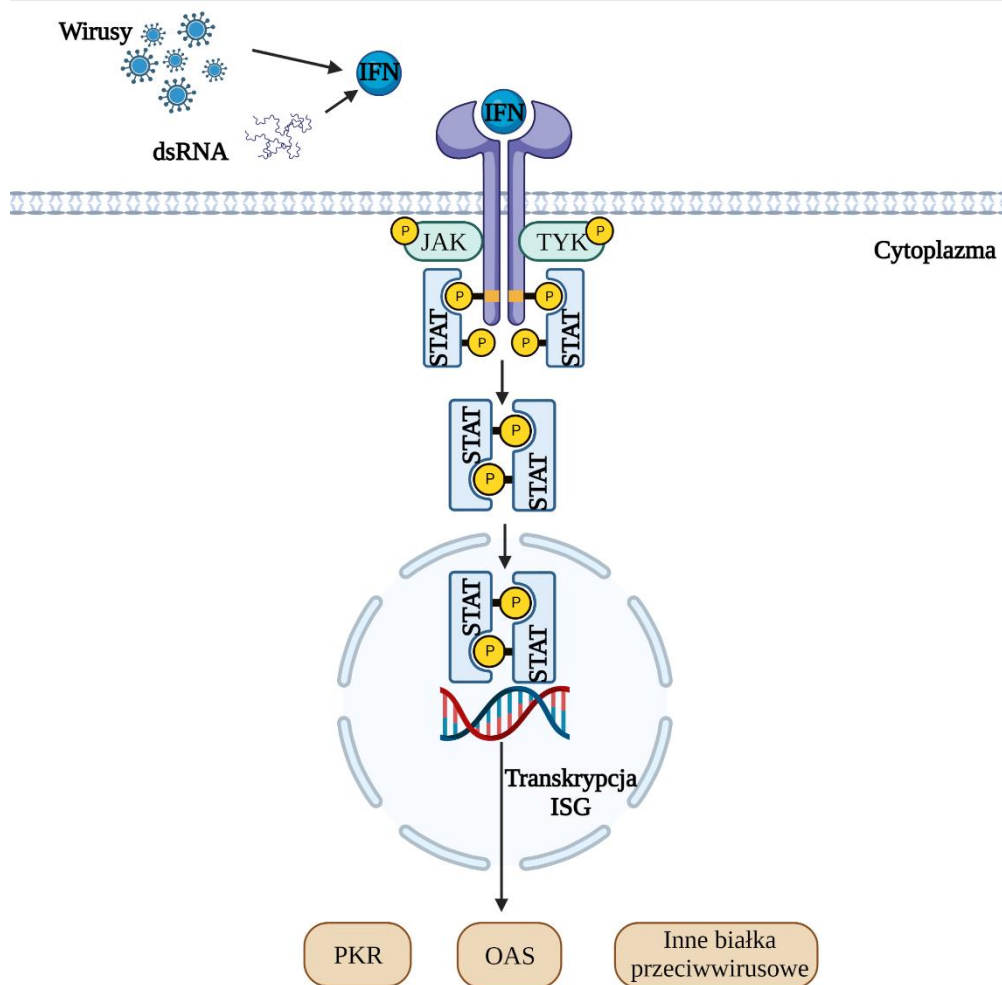
Pierwsze doniesienia dotyczące interferonu i jego istotnej roli w infekcjach wirusowych zostały opublikowane już w 1957 roku przez badaczy Alicka Isaacs i Jeana Lindenmanna. Zaobserwowali oni zahamowanie replikacji wirusa pod wpływem substancji interferującej, nazwanej interferonem (79). Interferony odgrywają główną rolę w indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej w komórkach nieimmunologicznych w fazie nieswoistej odpowiedzi odpornościowej. Przyczyniają się również do aktywacji i wzmocnienia prezentacji antygenu

komórkom immunologicznym oraz wyzwolenia swoistej odpowiedzi immunologicznej poprzez aktywację limfocytów T i B (80).

Interferony tworzą zróżnicowaną grupę cytokin składającą się z trzech typów: interferony typu I (IFN-I), typu II (IFN-II) oraz typu III (IFN-III). Interferony typu I stanowią największą rodzinę interferonów występujących u ludzi i myszy. Składa się ona z wielu podtypów IFN α (13 podtypów występujących u ludzi i 14 podtypów u myszy) oraz IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN ω (u ludzi) i IFN ζ (u myszy). Pełnią one wiele funkcji w organizmie, wykazując między innymi działanie przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Mają właściwości antyproliferacyjne i zdolne są do modulowania nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej. IFN typu I rozpoznawane są przez heterodimerski receptor składający się z podjednostek receptora 1 (IFNAR1) oraz receptora 2 (IFNAR2). Rodzina interferonów typu II składa się tylko z jednego członka – IFN γ . Produkowany jest on głównie przez komórki NK (ang. *natural killers*), komórki NKT (ang. *natural killer T cells*) oraz komórki limfoidalne, pełniąc modulującą rolę zarówno w nieswoistej jak i swoistej odpowiedzi immunologicznej. IFN γ wiąże się do komórek poprzez heterodimerski receptor składający się z podjednostek receptora 1 IFN γ (IFNGR1) oraz receptora 2 IFN γ (IFNGR2). Odkryta w 2003 roku grupa interferonów typu III składa się z IFN λ 1, IFN λ 2 oraz IFN λ 3 znanymi również jako IL29, IL28A oraz IL28B. Cytokiny te pełnią podobne funkcje do interferonów typu I jednak różnią się strukturalnie, dlatego klasyfikowane są jako odrębna klasa. Podobnie do IFN-I ekspresjonowane są przez większość komórek występujących w organizmie, jednak rozpoznawane są głównie przez komórki nabłonka i niektóre komórki immunologiczne, takie jak komórki dendrytyczne, komórki NK i neutrofile. Podobnie jak pozostałe typy, interferony typu III rozpoznawane są przez heterodimerski receptor składający się z receptora IFN typu III (IFNLR1/IL-28R α) oraz receptora 2 interleukiny 10 (IL-10R2) (81).

Interferony typu I są główną grupą cytokin wydzielanych przez komórki po rozpoznaniu materiału wirusowego przez receptory PRR, takie jak receptory Toll-podobne czy receptory RIG-I podobne. Rozpoznanie cząsteczek interferonów przez odpowiednie receptory na powierzchni komórki aktywuje kaskady sygnałowe prowadzące do ekspresji szerokiego wachlarza białek przeciwwirusowych. Główny szlak aktywowany przez związanie cząsteczki interferonu przez receptor IFNAR prowadzi do aktywacji kinaz tyrozynowych JAK1 (ang. *Janus kinase 1*) oraz TYK2 (ang. *tyrosine kinase 2*), które fosforylują odpowiednie reszty tyrozynowe czynników transkrypcyjnych STAT1 oraz STAT2 (ang. *signal transducer and activator of transcription*) (Rys. 4.7). Ufosforylowane czynniki STAT tworzą dimery, które ulegają translokacji do jądra komórkowego indukując ekspresję wielu genów stymulowanych interferonem (ISGs, ang. *interferon-stimulated genes*). Geny te mają właściwości przeciwwirusowe, antyproliferacyjne i immunoregulacyjne. Do najlepiej przebadanych ISG należy aktywowana dsRNA serynowo-treoninowa kinaza białkowa (PKR, ang. *protein kinase RNA-activated*), która wpływa na translację komórkowego mRNA i może hamować replikację wirusa. Interferon indukuje również ekspresję enzymów takich jak syntetaza oligoadenylowa (OAS, ang. *2',5'-oligoadenylate synthetase*) oraz RNaza L, które przyczyniają się do degradacji wirusowego RNA oraz komórkowego mRNA (80, 82). Z przebadanych dotychczas około 300 różnych ISG, 51 przyczynia się do obrony gospodarza, podczas gdy pozostałe odpowiadają

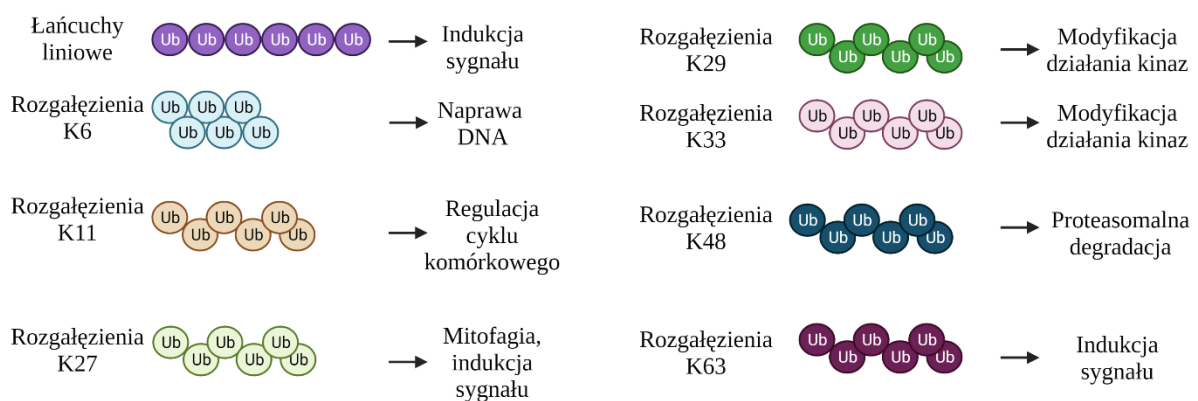
między innymi za rozwój stanu zapalnego, regulację transkrypcji i immunomodulację. Doniesienia literaturowe wskazują, że gwałtowna produkcja interferonów w wyniku infekcji aktywuje odpowiedź przeciwwirusową, natomiast przewlekłe wydzielanie interferonów może mieć hamujący wpływ na odpowiedź immunologiczną (83). Wykazano, że w przypadkach przewlekłego zakażenia wirusem limfocytarnego zapalenia opon mózgowych (LMCV) chroniczna produkcja interferonu prowadzi do supresji limfocytów T poprzez zwiększoną ekspresję PD-L1 (ang. *programmed death-ligand 1*) (84). Podczas zakażenia małpim wirusem niedoboru odporności (SIV) wczesne podanie IFN typu I skutkowało zmniejszeniem miana wirusa, natomiast przewlekłe podawanie IFN-I skutkowało zwiększeniem poziomu wirusa i deplecją limfocytów CD4+ (85). Dysregulacja wydzielania interferonu prowadzić może do wielu poważnych chorób autoimmunologicznych, takich jak toczeń rumieniowaty układowy, zespół Sjögrena, twardzina układowa, zapalenie mięśni czy reumatoidalne zapalenie stawów (86). Mechanizmy regulujące produkcję i wydzielanie interferonów są niezwykle ważnym elementem odpowiedzi immunologicznej, ponieważ zapewniają one nie tylko skuteczną ochronę podczas infekcji wirusowej, ale jednocześnie chronią przed rozwojem chorób autoimmunologicznych.



Rysunek 4.7 Schemat szlaku sygnałowego receptora IFNAR (82)

4.5. Rola ubikwitynacji w odpowiedzi przeciwwirusowej zależnej od receptorów RLR

Ubikwitynacja jest zależnym od ATP procesem modyfikacji potranslacyjnej, w którym cząsteczka ubikwityny o masie 8 kDa zostaje kowalencyjnie przyłączona do jednej lub więcej reszt lizyny białka docelowego. Proces ten składa się z trzech etapów: aktywacji, koniugacji i ligacji, w które zaangażowane są trzy różne enzymy. Pierwszy etap, w którym uczestniczy cząsteczka ATP, katalizowany jest przez enzym aktywujący ubikwitynę E1 i skutkuje utworzeniem wiązania tioestrowego pomiędzy ubikwityną, a enzymem E1. Kolejny etap polega na przeniesieniu ubikwityny z enzymu E1 na resztę cysteiny w miejscu aktywnym enzymu koniugującego ubikwitynę E2. Ostatni etap ubikwitynacji, katalizowany przez ligazę ubikwityny E3, skutkuje utworzeniem wiązania izopeptydowego pomiędzy C-końcówką resztą glicyny ubikwityny a resztą lizyny białka docelowego (87). Ponadto możliwe jest tworzenie łańcuchów ubikwityny poprzez przyłączanie kolejnych cząsteczek do reszt N-końcowej metioniny lub reszt lizyny cząsteczki ubikwityny. Obecność aż siedmiu reszt lizyny oraz reszty metioniny umożliwia tworzenie wielu rozgałęzień łańcucha poliubikwityny, uwzględniając rozgałęzienia tworzone przy resztach K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 oraz M1. Najlepiej poznaną funkcją ubikwitynacji jest kierowanie białek docelowych, posiadających łańcuchy ubikwityny z rozgałęzieniami przy resztach K48, do degradacji przez proteasom 26S. Natomiast tworzenie łańcuchów liniowych lub rozgałęzionych przy resztach K63 sprzyja interakcji pomiędzy białkami, pośrednicząc w transdukcji sygnału. Łańcuchy ubikwityny tworzone przez różne rozgałęzienia rozpoznawane są przez zróżnicowane mechanizmy komórkowe, co determinuje dalszy los ubikwitynowanego białka (Rys. 4.8) (88).



Rysunek 4.8 Rodzaje modyfikacji białek przez różne rodzaje rozgałęzień łańcuchów ubikwityny (89)

Ligazy ubikwityny E3 odpowiadają za specyficzność substratową ubikwitynacji, dlatego stanowią kluczowy element tego procesu. Aby wykorzystać funkcjonalność ubikwitynacji białek, w komórkach eukariotycznych wyewoluowały setki ligaz ubikwityny E3, które zbudowane są z niewielkiej liczby podstawowych rdzeni katalitycznych i szerokiej gamy modułów rekrutujących substrat. Wśród ligaz ubikwityny E3 możemy wyróżnić cztery rodziny:

ligazy typu RING (ang. *really interesting gene*), typu HECT (ang. *homologous to the E6-AP carboxyl terminus*), typu U-box (ang. *UFD2 homology*) oraz ligazy typu RBR (ang. *RING-in-between-RING*), z których każda przeprowadza koniugację ubikwityny do białka docelowego za pomocą innego mechanizmu. Najbardziej rozpowszechnione w organizmie ligazy E3 typu RING pełnią rolę pośrednika w bezpośrednim transferze cząsteczki ubikwityny z enzymu E2 na substrat. Przeciwnie, ligazy typu HECT tworzą wiązanie pośrednie pomiędzy ubikwityną a resztą cysteiny w miejscu katalitycznym ligazy, po którym następuje przeniesienie ubikwityny na substrat. Ligazy typu U-box pośredniczą w tworzeniu łańcuchów poliubikwityny, które zostały zapoczątkowane przez inne ligazy E3. Ligazy typu RBR katalizują koniugację ubikwityny wykorzystując mechanizm hybrydowy, gdzie jedna z domen RING odpowiada za interakcję z enzymem E2 oraz substratem, podczas gdy druga domena RING akceptuje cząsteczkę ubikwityny z enzymu E2 i przenosi ją na białko docelowe (89, 90).

Ubikwitynacja z rozgałęzieniami w miejscach K63 odgrywa niezwykle istotną rolę w transdukcji sygnału zależnej od receptorów RIG-I podobnych. Kluczową ligazą zaangażowaną w szlak sygnałowy zależny od receptorów RLR jest ligaza E3 typu RING – TRIM25. Wiąże się ona do C-końca jednej z domen CARD receptora RIG-I, po czym katalizuje ubikwitynację reszty lizyny 172 drugiej domeny CARD, tworząc rozgałęzienia w miejscach K63. Ubikwitynacja domeny CARD receptora RIG-I promuje jego interakcję z białkiem adaptorowym MAVS (91). Kolejną istotną ligazą zaangażowaną w przekazywanie sygnału od receptora RIG-I jest ligaza Riplet (znana również pod nazwą RNF135). Należy ona do rodziny ligaz E3 typu RING i katalizuje ubikwitynację domeny CTD receptora RIG-I. Tworząc łańcuchy z rozgałęzieniami w miejscach K63, przyczynia się do zmian konformacyjnych receptora co umożliwia jego aktywację (92). Wykazano, że ubikwitynacja może również negatywnie regulować odpowiedź przeciwwirusową zależną od receptorów RLR. Główną rolę w tym procesie odgrywa ligaza ubikwityny typu RING – RNF125. Wiąże się ona do receptora RIG-I, katalizując tworzenie łańcuchów ubikwityny z rozgałęzieniami w miejscach K48, co prowadzi do jego proteasomalnej degradacji. Ponadto RNF125 może katalizować również ubikwitynację MDA5 oraz MAVS, przyczyniając się do negatywnej regulacji odpowiedzi przeciwwirusowej (93). Ścieżka sygnałowa zależna od receptora MDA5 może być również negatywnie regulowana przez ligazę E3 typu RING TRIM13, skutkując zahamowaniem ekspresji *IFN β* (94). Białko adaptorowe MAVS może ulegać ubikwitynacji za pośrednictwem ligazy ubikwityny E3 typu HECT – AIP4. Ligaza ta tworzy łańcuchy poliubikwityny z rozgałęzieniami w miejscach K48 na resztach lizyn K371 i K420 białka MAVS, prowadząc do jego proteasomalnej degradacji (95).

Ubikwitynacja reguluje szlaki sygnałowe receptora RIG-I również na poziomie białek zaangażowanych w przekazywanie sygnału poniżej receptorów. Pierwszym białkiem poniżej białka adaptorowego MAVS w szlaku sygnałowym receptora RIG-I, które do swojej aktywności wymaga ubikwitynacji jest białko TRAF3. Białko to ulega autoubikwitynacji tworząc łańcuchy ubikwityny z rozgałęzieniami K63, co umożliwia aktywację TBK1 i IKK ϵ , skutkując wydzielaniem interferonów typu I w odpowiedzi na zakażenie wirusowe (96). Kolejnym białkiem, które ulega ubikwitynacji z rozgałęzieniami w miejscach K63 jest kinaza

TBK1. Ligazy ubikwityny Mind bomb 1 i 2 (MIB 1/2) tworzą łańcuchy ubikwityny na resztach lizyny K69, K154 i K372 kinazy TBK1 (97). W aktywacji przeciwwirusowych ścieżek sygnałowych pośredniczy również ubikwitynacja z rozgałęzieniami w miejscach K48. Ubikwitynacja podjednostki inhibitorowej I κ B α katalizowana przez ligazę E3 SCF ^{β TrCP} prowadzi do jej proteasomalnej degradacji, co umożliwia uwolnienie aktywnych podjednostek NF- κ B i ich translokację do jądra komórkowego (98). Ubikwitynacja z rozgałęzieniami w miejscach K48 zaangażowana jest też w negatywną regulację odpowiedzi przeciwwirusowej. Katalizowana przez ligazę DTX4 ubikwitynacja TBK1 prowadzi do destabilizacji tej kinazy (99). Ponadto czynniki transkrypcyjne IRF3 i IRF7 ulegają ubikwitynacji z rozgałęzieniami w miejscach K48 katalizowanej przez ligazę ubikwityny E3 RAUL, będącą ligazą typu HECT, co prowadzi do zahamowania wydzielania interferonów typu I (100).

W pracy opublikowanej przez nasz zespół w 2021 roku wykazano, że szlak sygnałowy receptora RIG-I regulowany jest również przez ligazę E3 typu RING Pellino3. W proponowanym modelu pełni ona rolę pozytywnego regulatora aktywacji kinaz ERK 1/2 oraz produkcji interferonów typu I i cytokin prozapalnych (101).

4.6. Ligazy ubikwityny E3 z rodziny Pellino

Białko Pellino zostało opisane po raz pierwszy przez zespół Christiane Nüsslein-Volhard w 1999 roku. Badacze wykazali, że Pellino uczestniczy w przekazywaniu sygnału od receptora Toll poprzez oddziaływanie z kinazą Pelle u wywilźni karłowatej (*Drosophila melanogaster*). Homologiczne sekwencje genów zostały zidentyfikowane w genomach nicieni, myszy i człowieka, co pozwoliło wysnuć wniosek że Pellino może pełnić podobne funkcje w tych organizmach. Zaproponowano, że u ssaków Pellino może pełnić funkcję partnera do oddziaływania z kinazą IRAK (102). Badania prowadzone w kolejnych latach pozwoliły zidentyfikować trzy białka z rodziny Pellino: Pellino1, Pellino2 oraz Pellino3 występujące u ludzi i myszy (103, 104). Początkowo uważano, że białka z tej rodziny pełnią funkcję rusztowania, pośrednicząc w przekazywaniu sygnału i oddziałując z białkami takimi jak IRAK1, TRAF6, TAK1 i NIK (ang. *NF- κ B-inducing kinase*) (104). Badania opublikowane w 2006 roku przez zespół Rudiego Beyaerta wykazały, że oprócz funkcji rusztowania białka Pellino funkcjonują również jako ligazy ubikwityny E3. Autorzy wykazali, że oddziaływanie kinazy IRAK1 z Pellino zależne jest od jej aktywacji i powiązane jest z fosforylacją Pellino. Ponadto nadekspresja Pellino1, Pellino2 oraz Pellino3 prowadziła do poliubikwitynacji IRAK1, która zależna była od motywu RING zidentyfikowanego we wszystkich trzech białkach Pellino, co pozwoliło wnioskować, że białka te pełnią rolę ligaz ubikwityny E3 typu RING (105).

Białka z rodziny Pellino cechują się wysoką konserwatywnością sekwencji oraz struktury pierwszorzędowej. Pierwsze badania bioinformatyczne wykazały obecność wzoru powtórzeń histydynowo-cysteinowych na C-końcu białek, które tworzą charakterystyczny motyw RING (103). Badania krystalograficzne N-końcowego fragmentu Pellino2 pozwoliły na zidentyfikowanie domeny FHA (ang. *forkhead-associated domain*), która odpowiedzialna jest za wiązanie motywów zawierających fosfotreoninę. Ponadto domena FHA otoczona jest fragmentami niespotykanymi wśród innych domen tego typu, które nazwano motywami

WING. Wykazano, że rdzeń domeny FHA odpowiedzialny za wiązanie motywów fosfotreoninowych jest konserwatywny wśród całej rodziny białek Pellino (Rys. 4.9) (106).



Rysunek 4.9 Schemat budowy białek z rodziny Pellino (106)

4.6.1. Pellino1

Ligaza ubikwityny E3 Pellino1 pełni istotną rolę w regulacji szlaków sygnałowych aktywowanych receptorami PRR. Pierwszą odkrytą funkcją tego białka była pozytywna regulacja szlaku sygnałowego aktywowanego receptorem interleukiny 1. W proponowanym modelu stymulacja interleukiną 1 (IL-1) prowadzi do rekrutacji MyD88 do receptora IL-1 (IL-1R), co z kolei promuje rekrutację IRAK4, IRAK1 oraz TRAF6. Podczas formowania tego kompleksu (kompleksu I) aktywacji ulega IRAK4, prowadząc do hiperfosforylacji IRAK1, promując interakcję Pellino1 z kompleksem IRAK4-IRAK1-TRAF6. Kompleks ten ulega zmianom konformacyjnym, co przyczynia się do jego uwolnienia od receptora i oddziaływania ze związanym z błoną kompleksem TAK1-TAB1-TAB2, skutkując utworzeniem pośredniego kompleksu II (IRAK-TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2). Następnie kompleks III (TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2) ulega translokacji z błony komórkowej do cytozolu, gdzie następuje aktywacja TAK1 skutkująca aktywacją NF- κ B (107). Badania prowadzone przez zespół Seoka Hee Parka wykazały, że aktywacja białek SMAD6 i SMAD7 przez stymulację TGF- β (ang. *transforming growth factor β*) hamuje szlak sygnałowy aktywowany receptorem IL-1 na drodze zależnej od Pellino1. Wykazano, że białka SMAD6 i SMAD7 oddziałują z Pellino1, co hamuje jego interakcję z kompleksem IRAK1-IRAK4-TRAF6 i w konsekwencji aktywację NF- κ B (108, 109). Badania te potwierdzają istotną rolę Pellino1 w przekazywaniu sygnału od receptora IL-1.

Badania przeprowadzone na myszach z delecją genu kodującego Pellino1 wykazały, że białko to jest istotne w regulacji szlaków sygnałowych zależnych od receptorów TLR3 i TLR4. Myszy wykazywały niezmienione funkcje życiowe, jednak były odporne na szok septyczny wywoływany ligandami dla TLR3 i TLR4. Aktywacja tych receptorów prowadzi do rekrutacji białek RIP1 i Pellino1. Następnie Pellino1 ulega aktywacji przez kompleks TBK1-IKK ϵ , co promuje Pellino1-zależną poliubikwitynację RIP1 i prowadzi do rekrutacji TAK1 oraz kompleksu IKK, skutkując aktywacją NF- κ B. Co ciekawe, pomimo tego, że aktywacja kompleksu TBK1-IKK ϵ prowadzi także do aktywacji IRF3 i produkcji IFN β , nie zaobserwowano spadku produkcji tej cytokiny. Sugeruje to, że Pellino1 selektywnie pośredniczy w TRIF-zależnej aktywacji NF- κ B, ale nie wpływa na aktywację IRF3 i ekspresję IFN β (110). Hipoteza ta została potwierdzona w pracy zespołu Iana Sabroe, gdzie wykazano, że w szlaku receptora TLR3 wyciszenie genu Pellino1 skutkowało obniżeniem produkcji cytokin prozapalnych, takich jak CXCL8, nie obniżając produkcji interferonów (111). W kontrze do tych badań stanęły wyniki opublikowane przez zespół Philipa Cohena, w których

wykazano że mutacja w miejscu odpowiedzialnym za aktywność ligazy E3 genu Pellino1 powoduje zmniejszoną ekspresję IFN β . Badacze zaproponowali model w którym Pellino1 indukuje interakcję IRF3 z promotorem IFN β w wyniku stymulacji receptora TLR3. Ponadto zaobserwowano wzrost ekspresji Pellino1 w wyniku stymulacji dwuniciowym RNA, podczas gdy ekspresja zmutowanej wersji Pellino1 pozostawała na niskim poziomie. Badania te pozostawiły otwarte pytanie, czy obniżona produkcja interferonu w komórkach z mutacją Pellino1 jest skutkiem braku aktywności ligazy E3 czy też obniżonej ekspresji tego białka (112). Odpowiedź na to pytanie została opublikowana przez ten sam zespół w 2013 roku. Badacze wykazali, że Pellino1 oddziałuje z czynnikiem DEAF1 (ang. *deformed epidermal autoregulatory factor 1*). Oddziaływanie to jest niezależne od aktywności ligaz E3 i promuje wiązanie DEAF1 do promotora IFN β oraz IRF3 i IRF7, co indukuje transkrypcję IFN β (113). Różne wnioski dotyczące zaangażowania Pellino1 w indukcję ekspresji IFN β mogą wynikać z kompensacji funkcji tego białka przez inne ligazy ubikwityny E3 w przypadku wyciszenia genu kodującego Pellino1 (106).

Oprócz istotnej roli jaką Pellino1 odgrywa w szlakach sygnałowych aktywowanych przez receptory PRR, białko to pełni również istotne funkcje w szlakach sygnałowych układu nerwowego. Zespół Chen Lu przeprowadził badania z wykorzystaniem myszy, u których zauważono zwiększony poziom Pellino1 w mikrogleju rdzenia kręgowego w wyniku urazu. Wykazano, że zwiększony poziom tego białka przyczyniał się do nadmiernej aktywacji MAP kinaz oraz czynnika NF- κ B, zwiększając produkcję cytokin prozapalnych, czemu towarzyszyła aktywacja mikrogleju i utrzymywanie bólu neuropatycznego wywołanego urazem (114). Badania opublikowane przez zespół Yichuan Xiao pozwoliły ustalić, że Pellino1 jest istotnym mediatorem w regulacji aktywacji mikrogleju i wywołanej stanem zapalnym śmierci neuronów dopaminergicznych podczas patogenezy choroby Parkinsona poprzez regulację aktywacji kinaz MAP i czynnika NF- κ B (115). Wykazano również, że Pellino1 zaburza fagocytozę amyloidu β poprzez promowanie degradacji białka C/EBP β (ang. *CCAAT/enhancer binding protein*), przyczyniając się do rozwoju choroby Alzheimerera (116).

4.6.2. Pellino2

Ligaza ubikwityny E3 Pellino2 jest najmniej poznanym białkiem z rodziny Pellino. Podobnie jak Pellino1 bierze ona udział w regulacji szlaków sygnałowych zależnych od receptorów TLR oraz IL-1R. Pierwsze badania przeprowadzone na mysich komórkach wykazały, że Pellino2 oddziałując z kinazą IRAK1 pełni kluczową rolę w aktywacji czynnika NF- κ B w odpowiedzi na stymulację IL-1 oraz LPS (117). Obserwacje te zostały potwierdzone na ludzkiej linii embrionalnych komórek nerek oraz ludzkich makrofagach. Badania prowadzone przez zespół Xiaoxia Li wykazały, że Pellino2 jest odpowiedzialne za poliubikwitynację IRAK1, promując tworzenie kompleksu IRAK1-TAK1, a tym samym aktywację TAK1. W komórkach z wyciszonym genem Pellino2 stymulowanych lipopolisacharydem lub interleukiną 1, zaobserwowano osłabioną aktywację TAK1 i zależną od niej fosforylację IKK α/β oraz degradację I κ B α podczas gdy aktywacja NF- κ B zależna od MEKK3 została zachowana. Ponadto zaobserwowano zmniejszoną ekspresję cytokin

prozapalnych, czemu towarzyszyło zwiększone tempo rozpadu mRNA kodujących te cytokiny, co sugeruje że Pellino2 pełni istotną rolę w kontroli potranskrypcyjnej w szlakach sygnałowych aktywowanych TLR/IL-1R (118). Pellino2 jest również zaangażowane w aktywację MAP kinaz, co prowadzi do aktywacji AP-1 oraz Elk-1 (ang. *ETS-like 1 transcription factor*) (119).

Pierwsze doniesienia dotyczące fizjologicznej roli Pellino2 z wykorzystaniem modelu mysiego opublikowane w 2018 roku przez grupę Paula Moynagha wykazały, że białko to uczestniczy w aktywacji inflamasomu NLRP3 w wyniku stymulacji lipopolisacharydem oraz infekcji bakteryjnej. Badacze zaproponowali model, w którym Pellino2 katalizuje poliubikwitynację NLRP3 z rozgałęzieniami w miejscach K63 w fazie jego aktywacji. Ponadto zaobserwowano, że IRAK1 negatywnie reguluje ubikwitynację NLRP3, ale efekt ten może być znoszony przez zależną od Pellino2 ubikwitynację kinazy IRAK1, co osłabia jej interakcję z NLRP3. Potrzeba tak złożonej kontroli aktywacji inflamasomu wynika ze szkodliwych konsekwencji rozregulowanej aktywności NLRP3 w odpowiedzi na infekcję oraz w chorobach autoimmunologicznych (120).

4.6.3. Pellino3

Trzecia ligaza ubikwityny E3 z rodziny Pellino – Pellino3 została opisana po raz pierwszy w 2003 roku przez Liselotte Jensen i Alexandra Whiteheada. Analiza sekwencji zgromadzonych w bazie danych NCBI EST pozwoliła na zidentyfikowanie białka wykazującego 84% homologii do Pellino1 oraz 85% homologii do Pellino2. Dodatkowo wykazano, że Pellino3 występuje w dwóch wariantach splicingowych, nazwanych Pellino3a i Pellino3b, gdzie Pellino3a posiada w swojej sekwencji 24 aminokwasy więcej niż Pellino3b. Badania funkcji nowoodkrytego białka, oparte na jego nadekspresji w ludzkiej linii komórek wątroby oraz embrionalnych komórkach nerek wykazały, że Pellino3 promuje aktywację kinazy JNK, co prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych c-Jun oraz Elk-1. Nie zaobserwowano jednak aktywacji czynnika NF-κB. Wykazano również, że Pellino3 zdolne jest do oddziaływania z IRAK1, TRAF6, TAK1 oraz kinazą NIK, a oddziaływanie to jest zależne od aktywacji receptora interleukiny 1 (104). W szlaku zależnym od IL-1R, Pellino3 jest również silnym aktywatorem MAP kinaz p38, co jest unikalną cechą wśród białek z rodziny Pellino. Pellino3 pełni w tym procesie funkcję rusztowania podczas tworzenia kompleksu z TAK1 oraz TRAF6, skutkując aktywacją p38, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego CREB (ang. *cAMP-responsive element-binding protein*) (121).

Rola ligazy Pellino3 została również zidentyfikowana w regulacji ścieżki proapoptotycznej aktywowanej TNFα. Stymulacja receptora TNFR1 (ang. *tumor necrosis factor receptor 1*) powoduje rekrutację białka domeny śmierci związanego z TNFR1 (TRADD, ang. *TNFR1-associated death domain protein*), po której następuje rekrutacja kinazy RIP1. Wykazano, że ligaza Pellino3 blokuje oddziaływanie kinazy RIP1 z białkiem adaptorowym FADD (ang. *FAS-associated death domain-containing protein*) oraz prokaspazą 8, blokując tym samym tworzenie kompleksu DISC (ang. *death-induced signalling complex*) i zaburzając szlak proapoptotyczny (122).

Badania prowadzone na przestrzeni ostatnich 10 lat pozwoliły na poznanie roli Pellino3 w regulacji szlaków sygnałowych receptorów PRR. Wykazano istotną rolę tej ligazy w aktywacji odpowiedzi odpornościowej indukowanej zakażeniem bakteryjnym. Aktywacja receptora NOD2 (ang. *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) następująca poprzez rozpoznanie peptydów bakteryjnych powoduje oligomeryzację receptora, co prowadzi do rekrutacji RIP2. Następnie RIP2 rekrutuje ligazę Pellino3, która katalizuje jej poliubikwitynację z rozgałęzieniami w miejscach K63, co umożliwia rekrutację TAK1 i kompleksu IKK, skutkując aktywacją NF- κ B. Aktywacja TAK1 prowadzić może również do aktywacji MAP kinaz, skutkując aktywacją czynników transkrypcyjnych takich jak AP-1, co wspólnie z aktywnością NF- κ B indukuje ekspresję cytokin i chemokin prozapalnych (123). W szlakach sygnałowych zależnych od receptorów TLR2 oraz TLR4 ligaza Pellino3 pełni rolę negatywnego regulatora aktywacji ścieżki NF- κ B i produkcji cytokin prozapalnych. Wykazano, że nadekspresja Pellino3 prowadzi do zmniejszonej aktywacji NF- κ B oraz zmniejszonej ekspresji cytokin takich jak *Il8* oraz *Cxcl20* w odpowiedzi na stymulację ligandem dla TLR2 – Pam₂CSK₄ oraz lipopolisacharydem *H. pylori*. Odwrotny efekt obserwowano w przypadku wyciszenia genu kodującego Pellino3 (124). Podobne rezultaty otrzymano w wyniku stymulacji linii ludzkich monocytów (THP-1) inaktywowaną formą bakterii *S. aureus* (125). W szlaku sygnałowym zależnym od receptora TLR4 ligaza Pellino3, zrekrutowana uprzednio przez IRAK1, odpowiedzialna jest za monoubikwitynację TANK (ang. *TRAF family member-associated NF- κ B acivator*). Skutkuje to zaburzeniem TANK-zależnej rekrutacji TBK1 przez TRAF3, uniemożliwiając aktywację IRF3 i ekspresję IFN β (126). Wykazano również, że nadekspresja Pellino3 hamuje zależną od receptora TLR4 aktywację NF- κ B oraz ekspresję *CXCL8* (125).

Ligaza ubikwityny Pellino3 pełni istotną funkcję w regulacji szlaków sygnałowych aktywowanych infekcją wirusową. W szlaku zależnym od receptora TLR3, ligaza Pellino3 pełni rolę negatywnego regulatora produkcji interferonów typu I. Badania przeprowadzone na makrofagach wyizolowanych ze szpiku kostnego myszy wykazały, że stymulacja komórek z nokautem genu *Peli3* ligandem dla receptora TLR3 – poly:IC lub infekcja wirusem EMCV prowadzi do zwiększonej produkcji interferonów typu I oraz CXCL10 w porównaniu do komórek typu dzikiego. Podobny efekt zaobserwowano podczas eksperymentów prowadzonych z wykorzystaniem mysich fibroblastów oraz komórek dendrytycznych. Ponadto myszy z nokautem genu kodującego Pellino3 charakteryzowały się większą przeżywalnością po infekcji wirusem EMCV. Obserwowane efekty związane są z ubikwitynacją TRAF6, w której pośredniczy Pellino3. W proponowanym modelu, rozpoznanie dwuniciowego RNA przez receptor TLR3 prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych IRF3 oraz IRF7 na drodze zależnej od kompleksu TBK1-IKK ϵ oraz ubikwitynacji czynnika IRF7 zależnej od TRAF6, co wspólnie prowadzi do produkcji interferonów typu I. Aktywacja IRF3 skutkuje również zwiększoną ekspresją Pellino3, które odpowiada za ubikwitynację z rozgałęzieniami w miejscach K63 białka TRAF6. Uniemożliwia to zarówno jego interakcję z IRF7 jak i ubikwitynację tego czynnika. Skutkuje to zahamowaniem translokacji IRF7 do jądra komórkowego i zablokowaniem ekspresji interferonów typu I (127).

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem unieśmiertnionej linii komórkowej mysich makrofagów infekowanych wirusem VSV wykazały, że w szlaku aktywowanym przez receptor RIG-I ligaza Pellino3 pełni rolę pozytywnego regulatora produkcji interferonów typu I oraz cytokin prozapalnych. Zaobserwowano również zwiększoną replikację wirusa w komórkach z nokautem genu *Peli3* i wynikającą z tego zwiększoną śmiertelność tych komórek w porównaniu z komórkami typu dzikiego. Dodatkowo wykazano, że Pellino3 pełni rolę pozytywnego regulatora aktywacji kinaz ERK 1/2, a aktywność tych kinaz wpływa na produkcję cytokin prozapalnych i w konsekwencji na efektywność namnażania wirusa oraz śmiertelność zainfekowanych komórek (101).

5. Cel pracy

Ubikwitynacja jest procesem modyfikacji potranslacyjnej białek, który odgrywa istotną rolę w regulacji wielu funkcji biologicznych, w tym odpowiedzi odpornościowej. Najlepiej poznaną funkcją ubikwitynacji jest kierowanie białek do proteasomalnej degradacji. Ubikwitynacja jest również istotna w regulacji cyklu komórkowego czy aktywacji konkretnych białek w szlakach sygnałowych. Za specyficzność substratową tego procesu odpowiadają ligazy ubikwityny E3, które skupiły uwagę badaczy na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci.

Ligaza ubikwityny E3 Pellino3 pełni istotne funkcje w regulacji nieswoistej odpowiedzi odpornościowej. Do tej pory jej rola została opisana w szlakach sygnałowych zależnych od receptorów TLR3, TLR2, TLR4, NOD, TNFR oraz RIG-I. Badania te prowadzone były z wykorzystaniem mysich makrofagów lub ludzkich komórek monocytarnych. Biorąc pod uwagę istotną rolę komórek nabłonka w indukcji odpowiedzi odpornościowej podczas infekcji wirusowej, w niniejszej pracy postanowiono zbadać rolę ligazy Pellino3 w szlaku sygnałowym receptora RIG-I aktywowanym przez zakażenie wirusem grypy typu B w komórkach nabłonka płuc. W tym celu przeprowadzono analizę ekspresji i produkcji interferonów typu I oraz aktywacji innych czynników istotnych w odpowiedzi przeciwwirusowej, takich jak aktywacja czynników transkrypcyjnych STAT czy produkcja CXCL10. Podjęto również próbę identyfikacji białek biorących udział w szlaku sygnałowym receptora RIG-I, które regulowane są przez ligazę Pellino3.

6. Materiały i metody

6.1. Materiały

6.1.1. Odczynniki chemiczne i reagenty

Nazwa	Producent
2-merkaptoetanol	Merck, Darmstadt, Niemcy
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, Hercules, USA
10x bufor reakcyjny dla DNazy I z dodatkiem MnCl ₂	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Agaroza	Merck, Darmstadt, Niemcy
Akrylamid/Bisakrylamid 37,5:1 roztwór 30%	Bio-Rad, Hercules, USA
Albumina surowicy wołowej	Merck, Darmstadt, Niemcy
Bambanker	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Niemcy
Blastycydyna	Invivogen, San Diego, USA
Błękit trypanu	Bio-Rad, Hercules, USA
Bufor do polimerazy DNA RedTaq 10x	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Bufor obciążający DNA Gel Loading Dye 6x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Chlorek sodu	POCh, Gliwice
Chloroform	POCh, Gliwice
Deoksyholan sodu	Merck, Darmstadt, Niemcy
Deoksyrybonukleotydy (dNTP)	Promega, Fitchburg, USA
Ditiotreitol (DTT)	LOBA-Chemie, Mumbai, Indie
Diwodorofosforan potasu	POCh, Gliwice
DNaza I wolna od RNaz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	Serva, Heidelberg, Niemcy
Etanol	POCh, Gliwice
Glicyna	Merck, Darmstadt, Niemcy
HEPES	Merck, Darmstadt, Niemcy
Hydroliant kazeiny	VWR International, Radnor, USA
Igepal	Merck, Darmstadt, Niemcy
Interferon β (IFNβ)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Izopropanol	POCh, Gliwice
Koktajl inhibitorów proteaz cOPMLETE Mini EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy
Koktajl inhibitorów fosfataz PhosSTOP Mini EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy
Kwas wersenowy (EDTA)	POCh, Gliwice

Kwas octowy	Merck, Darmstadt, Niemcy
Medium DMEM, high glucose, GlutaMAX	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Medium RPMI, high glucose, GlutaMAX	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Medium OPTI-MEM	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Metanol	POCh, Gliwice
Midori Green Advance	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Niemcy
Molekularne standardy cząsteczkowych mas białkowych	Bio-Rad, Hercules, USA
Molekularne standardy mas DNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nadsiarczan amonu (APS)	Fluka, Bachs, Szwajcaria
Nitroceluloza	Bio-Rad, Hercules, USA
N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Normocyna	Invivogen, San Diego, USA
Płodowa surowica bydłęca (FBS)	Merck, Darmstadt, Niemcy
Polimeraza DNA RedTaq	Merck, Darmstadt, Niemcy
QUANTI-Blue	Invivogen, San Diego, USA
QUANTI-Luc	Invivogen, San Diego, USA
Sól fizjologiczna buforowana fosforanem bez jonów wapnia i magnezu (PBS)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TRI Reagent	Merck, Darmstadt, Niemcy
Tris-HCl	Merck, Darmstadt, Niemcy
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Niemcy
Trypsyna 10x	Merck, Darmstadt, Niemcy
Tween-20	Merck, Darmstadt, Niemcy
Woda wolna od nukleaz	Merck, Darmstadt, Niemcy
Wodorofosforan sodu	POCh, Gliwice
Zeocyna	Invivogen, San Diego, USA

6.1.1.1. Inhibitory

Nazwa	Substrat	Stosowane stężenie	Producent
FR180204	ERK 1/2	2 μ M	Merck, Darmstadt, Niemcy
SP600125	JNK	10 μ M	Selleck Chemicals GmbH
SB202190	p38	5 μ M	Selleck Chemicals GmbH
JSH-23	NF- κ B	10 μ M	Merck, Darmstadt, Niemcy

6.1.2. Zestawy gotowe

Przeznaczenie	Nazwa	Producent
Zestaw do odwrotnej transkrypcji	iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR	Bio-Rad, Hercules, USA
Zestaw do reakcji PCR	REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Merck, Darmstadt, Niemcy
Zestaw do reakcji PCR w czasie rzeczywistym	iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad, Hercules, USA
Zestaw do izolacji plazmidów	PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Madison, USA
Zestaw ELISA do oznaczania ludzkiego CXCL10	Human CXCL10/IP-10 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Zestaw do pomiaru stężenia białka metodą BCA	Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zestaw do transfekcji	Lipofectamine 3000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

6.1.3. Bufory i żele

Nazwa	Skład
TAE	40 mM Tris 20m M kwas octowy 2 mM EDTA
HS	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 5 M NaCl 0,5% Igepal 50 mM NaF 0,1 mM Na ₃ VO ₄ 0,1 M PMSF 0,5 mM ditioeterol 0,25% deoksyholan sodu 10 µl/ml mieszaniny inhibitorów proteaz Complete mini
RIPA	50 mM Tris-HCL pH 7,4 150 mM NaCl 1% Triton X-100 0,5% deoksyholan sodu 0,1% SDS 5 mM EDTA

	10 µl/ml mieszaniny inhibitorów proteaz Complete mini	
	10 µl/ml mieszaniny inhibitorów fosfataz Complete mini	
Żel zagęszczający 5% (10 ml) do SDS-PAGE	H2O 30% Acrylamide/Bis Solution (37,5:1) 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 10% SDS 10% nadsiarczan amonu TEMED	6,8 ml 1,7 ml 1,25 ml 0,1 ml 0,1 ml 10 µl
Żel rozdzielający 12% (20 ml) do SDS-PAGE	H2O 30% Acrylamide/Bis Solution (37,5:1) 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 10% SDS 10% nadsiarczan amonu TEMED	6,6 ml 8,0 ml 5,0 ml 0,2 ml 0,2 ml 8 µl
Bufor elektrodowy do SDS-PAGE	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM glicyna 0,1 % SDS	
Bufor do transferu	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM glicyna 20% metanol	
TBS	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl	
TBS-T	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05% Tween-20	

6.1.4. Startery do PCR

Gen	Sekwencja starterów	Długość fragmentu (pz)
<i>HPRT1</i>	F: 5'-TGGAGTCCTATTGACATCGCCAGT-3' R: 5'-AACAATCCGCCCAAAGGGAAGTGA-3'	193
<i>IFNB1</i>	F: 5'-GCCGCATTGACCATCTATGA-3' R: 5'-GCCAGGAGGTTCTCAACAATAG-3'	103
<i>DDX58</i>	F: 5'-CACCTCAGTTGCTGATGAAGGC-3' R: 5'-GTCAGAAGGAAGCACTTGCTACC-3'	138
<i>MAVS</i>	F: 5'-ATGGTGCTCACCAAGGTGTCTG-3' R: 5'-TCTCAGAGCTGCTGTCTAGCCA-3'	133
<i>TRAF3</i>	F: 5'-CGTGGAGAAGGCGTGTAATA-3' R: 5'-GTCGGTGTCTTCGTGTTTCT-3'	94
<i>TRAF6</i>	F: 5'-CACGTTGCACACACTCAAATAC-3' R: 5'-CATCTGCGCCTTACCATCTAA-3'	112

6.1.5. Przeciwciała

Nazwa	Opis	Producent
p-ERK 1/2	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
ERK 1/2	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ERK 1/2	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-JNK	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
JNK	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko JNK	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-p38	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie p38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p38	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko p38	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
GAPDH	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko GAPDH	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
IκBα	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko IκBα	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-IRF7	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie IRF7 (Ser471/472)	Biorbyt, Cambridge, UK
IRF7	Przeciwciała mysie skierowane przeciwko IRF7	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
p-IRF3	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie IRF3 (Ser396)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
IRF3	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko IRF3	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-ATF-2	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie ATF-2 (Thr71)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
ATF-2	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ATF-2	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-c-Jun	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie c-Jun (Ser73)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
c-Jun	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko c-Jun	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

TRAF3	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko TRAF3	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
TRAF6	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko TRAF6	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Flag	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko metce FLAG (polipeptyd DYKDDDDK)	Merck, Darmstadt, Niemcy
Myc	Przeciwciała mysie skierowane przeciwko metce Myc	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
HA	Przeciwciała mysie skierowane przeciwko metce hemaglutyniny (HA), 101r	Covance, Princeton, USA
p-STAT1	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie STAT1 (Tyr701)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
STAT1	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko STAT1	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-STAT2	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie STAT2 (Tyr690)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
STAT2	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko STAT2	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
IFNAR ab	Przeciwciała mysie blokujące receptor IFNAR2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H+ L)	Drugorzędowe przeciwciała kozie skierowane przeciwko IgG królika, skoniugowane z barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni	Li-COR Biosciences, Lincoln, USA
IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG (H + L)	Drugorzędowe przeciwciała kozie skierowane przeciwko IgG myszy, skoniugowane z barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni	Li-COR Biosciences, Lincoln, USA

6.1.6. Plazmidy

Plazmidy ekspresyjne wykorzystane do koimmunoprecypitacji oraz badania ubikwitinacji otrzymano dzięki uprzejmości prof. Paula Moynagha z Uniwersytetu Maynooth w Irlandii.

pcDNA 3.1-Peli3-Myc – plazmid kodujący gen białka Pellino3 z metką Myc

pcDNA 3.1-TRAF3-Flag – plazmid kodujący gen białka TRAF3 z metką Flag

pcDNA 3.1-UbWT-HA – plazmid kodujący gen ubikwityny z metką HA

pcDNA 3.1-UbK48-HA – plazmid kodujący gen białka ubikwityny z mutacją w miejscu K48 z metką HA

6.1.7. Linie komórkowe

Linia komórkowa	Typ	Pochodzenie	Medium
A549 WT	Ludzka linia komórkowa niedrobnokomórkowego nowotworu płuc	Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych (ATCC)	DMEM 10%FBS 1 µg/ml normocyna
A549 <i>PELI3</i> ^{-/-}	Ludzka linia komórkowa niedrobnokomórkowego nowotworu płuc z nokautem genu <i>PELI3</i>	Wyprowadzona z komórek typu dzikiego metodą CRISPR-Cas9 w Zespole Badawczym Bioinżynierii (Łukasiewicz-PORT)	DMEM 10%FBS 1 µg/ml normocyna
HEK-Blue™ IFNα/β	Ludzka linia embrionalnych komórek nerek posiadająca system reporterowy umożliwiający badanie aktywacji ścieżek sygnałowych aktywowanych interferonami typu I	Invivogen, USA	DMEM 10%FBS 1 µg/ml normocyna 30 µg/ml blastocydyna

A549 Dual™	Ludzka linia komórkowa niedrobnokomórkowego nowotworu płuc posiadająca system reporterowy umożliwiający badanie ścieżek sygnałowych NF-κB oraz IRF	Invivogen, USA	DMEM 10%FBS 1 μg/ml normocyna 30 μg/ml blastycydyna 100 μg/ml zeocyna
A549 Dual™ KO-RIG-I	Ludzka linia komórkowa niedrobnokomórkowego nowotworu płuc z nokautem genu <i>DDX58</i> posiadająca system reporterowy umożliwiający badanie ścieżek sygnałowych NF-κB oraz IRF	Invivogen, USA	DMEM 10%FBS 1 μg/ml normocyna 10 μg/ml blastycydyna 100 μg/ml zeocyna
A549 Dual™ KO-MDA5	Ludzka linia komórkowa niedrobnokomórkowego nowotworu płuc z nokautem genu <i>IFIH1</i> posiadająca system reporterowy umożliwiający badanie ścieżek sygnałowych NF-κB oraz IRF	Invivogen, USA	DMEM 10%FBS 1 μg/ml normocyna 10 μg/ml blastycydyna 100 μg/ml zeocyna
U-2 OS	Ludzka linia komórkowa kostniakomięsaka	Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych (ATCC)	DMEM 10%FBS 1 μg/ml normocyna
MDCK	Linia komórkowa pochodząca z psiej nerki Madin Darby'ego	Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych (ATCC)	DMEM 10%FBS 1 μg/ml normocyna

6.1.8. Wirus grypy typu B

Wirus grypy szczep B/Taiwan/2/62 (VR-1735™) został zakupiony w Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC).

6.1.9. Aparatura, akcesoria i programy komputerowe

Nazwa	Producent
Aparat do elektroforezy agarozowej Mini-Sub Cell	Bio-Rad, USA
Aparat do elektroforezy białkowej Mini-PROTEAN®	Bio-Rad, USA
Czytnik płytek LUMIstar Omega	BMG Labtech, Niemcy
Czytnik płytek Synergy H4	BioTek, USA
DRG E-LizaMat X-2	DGR MedTek, Polska
Gel Doc XR+System	Bio-Rad, USA
Inkubator C 150	Binder, Niemcy
Jednorazowy sprzęt plastikowy: końcówki do pipet, płytki hodowlane, płytki polistyrenowe, szalki Petriego, probówki	Corning Inc., USA; Medlab, Niemcy; Starstedt, Niemcy; Eppendorf, Niemcy
Komora laminarna klasy II Mars 1200	LaboGene, Dania
Licznik komórek TC20	Bio-Rad, USA, USA
Mikroskop fluorescencyjny Axio Vert.A1	Carl Zeiss, Niemcy
Nanofotometr	IMPLEN, Niemcy
Pipety automatyczne	Eppendorf, Niemcy
Skaner podczerwieni Odyssey CLx	Li-Cor Biosciences, USA
Termocykler CFX-Connect	Bio-Rad, USA
Termocykler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Niemcy
Criterion Blotter	Bio-Rad, USA
Wirówka 5424 R	Eppendorf, Niemcy
Wirówka 5804 R	Eppendorf, Niemcy
Wirówka stołowa bez chłodzenia Mini Spin	Eppendorf, Niemcy
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, USA
Image Studio ver 2.0	Li-Cor Biosciences, USA
BioRender	Toronto, Kanada
MS Office	Microsoft, USA

6.2. Metody

6.2.1. Hodowle komórkowe

Hodowla linii komórkowych prowadzona była w butelkach hodowlanych o powierzchni 75 cm² w atmosferze 5% CO₂ w 37°C w mediach zebranych w rozdziale 6.1.7. Komórki pasażowano 2 razy w tygodniu, stosując 0,05% trypsynę z 0,02% EDTA w DPBS. Do eksperymentów wykorzystywano komórki między 2, a 8 pasażem. Do krioprezerwacji komórek używano medium Bambanker.

6.2.2. Namnażanie wirusów

Do namnażania wirusa grypy typu B (IBV) wykorzystano linię komórkową MDCK. Komórki hodowano w butelkach T-75 w 5% atmosferze CO₂ w 37°C i infekowano je w momencie uzyskania 70% konfluencji. W celu zainfekowania komórek zebrano medium komórkowe, komórki przepłukano dwukrotnie buforem DPBS, a następnie naniesiono 3 ml zawiesiny wirusa. Adsorpcję prowadzono przez godzinę w atmosferze 5% CO₂ w 35°C, kołysząc butelką co 15 minut w celu dokładnego rozprowadzenia zawiesiny wirusowej. Następnie dodano 10 ml medium i kontynuowano hodowlę do zaobserwowania efektu cytopatycznego. Komórki razem z medium hodowanym mrożono w -80°C. Po rozmrożeniu medium hodowlane zebrano i wirowano przez 15 minut przy 15000 x g w 4°C. Uzyskany nadsącz zebrano, rozpipetowano po 100 µl i mrożono w -80°C.

6.2.3. Oznaczanie miana wirusów

Miano wirusów oznaczane było metodą TCID₅₀ poprzez miareczkowanie z wykorzystaniem testu żywotności komórek alamarBlue. Badany nadsącz rozcieńczono w postępie logarytmicznym (10⁻¹ do 10⁻⁹). Komórki MDCK wysiewano na 96-dołkową płytkę w gęstości 50 tys. komórek na dołek. Po 24 godzinach usunięto medium znad komórek i przepłukano je dwukrotnie buforem DPBS, a następnie naniesiono po 20 µl zawiesiny wirusa w 5 powtórzeniach. Kontrolę negatywną stanowiły komórki na które naniesiono DPBS. Po upływie godziny, na dołki naniesiono po 200 µl medium hodowlanego. Płytki inkubowano 72h w atmosferze 5% CO₂ w 35°C. Przeprowadzano ocenę efektu cytopatycznego, a następnie odrzucono nadsącz komórkowy i наносzono po 100 µl 10% roztworu alamarBlue w medium hodowlanym. Po upływie 4 godzin przeprowadzano pomiar fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 560 nm i długości fali emisji 590 nm. Miano wirusa określano przy takim rozcieńczeniu nadsączy, przy którym obserwowano około 50% żywotności komórek.

6.2.4. Przygotowanie plazmidów

Bakterie DH5α ekspresjonujące plazmidy Peli3-Myc, TRAF3-Flag, Ub WT-HA, Ub K48-HA oraz EV przechowywane były w medium LB z dodatkiem 25% glicerolu w -80°C.

6.2.4.1. Hodowla bakteryjna

Do 50 ml medium LB zawierającego odpowiedni antybiotyk selekcyjny zaszczepiano eż bakterie pobrane z odpowiednich krioprobówek. Hodowlę prowadzono przez noc w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 180 rpm.

6.2.4.2. Izolacja plazmidów

Izolację plazmidów przeprowadzano z zastosowaniem zestawu PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega) postępując ściśle według zaleceń producenta. Hodowlę bakteryjną wirowano przy 5000 x g przez 10 minut. Odrzucono supernatant, a osad zawieszono w 3 ml buforu do zawieszania bakterii (Cell Resuspension Solution). Następnie dodano 3 ml buforu lizującego (Cell Lysis Solution), wymieszano i inkubowano 3 minuty w temperaturze pokojowej. W kolejnym kroku dodano 5 ml buforu neutralizującego (Neutralization Solution) i wymieszano. Zlizowane bakterie wirowano przy 15000 x g przez 15 minut. Następnie na komorze próżniowej umieszczono kolumnę wiążącą (PureYield™ Clearing Column) oraz kolumnę oczyszczającą (PureYield™ Binding Column). Otrzymany po wirowaniu supernatant zdekantowano na kolumnę oczyszczającą, podłączono próżnię. Po przejściu roztworu przez kolumny odrzucono kolumnę oczyszczającą. Następnie na kolumnę wiążącą dodano 5 ml buforu usuwającego endotoksyny (Endotoxin Removal Wash) i ponownie podłączono próżnię. Na kolumnę naniesiono 20 ml buforu myjącego (Column Wash Solution) i podłączono próżnię. Kolumnę osuszano pod próżnią przez kolejną minutę. Następnie probówkę typu eppendorf umieszczono w narzędziu do elucji (Eluator™ Vacuum Elution Device), które umieszczono na komorze próżniowej. Na narzędziu do elucji umieszczono kolumnę wiążącą i naniesiono na nią 400 µl wody wolnej od nukleaz i inkubowano przez minutę. Następnie podłączono próżnię na kolejną minutę. Stężenie i czystość wyizolowanych plazmidów oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=260$ nm i $\lambda=280$ nm przy użyciu aparatu Nanophotometer®P 360.

6.2.5. Analiza ekspresji genów

6.2.5.1. Stymulacja komórek

Komórki wysiewano na płytki 6-dołkowe w ilości 1×10^6 komórek/dołek w medium hodowlanym i pozostawiano na kolejne 24 godziny w atmosferze 5% CO₂ w 37°C. Następnie komórki infekowano wirusem grypy typu B (IBV) w ilości 1,5 MOI (ang. multiplicity of infection) przez 4 godziny. W przypadku zastosowania inhibitorów, dodawane one były na godzinę przed infekcją wirusową. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszony był wirus.

6.2.5.2. Izolacja RNA

Całkowite RNA izolowano z wykorzystaniem odczynnika TRI Reagent (Merck), postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki lizowano używając 0,5 ml TRI Reagentu, następnie dodawano 0,1 ml chloroformu i wytrząsano przez 15 sekund. Mieszaninę inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 15 minut przy 12000 x g w 4°C. Górną fazę wodną zbierano do czystej probówki i dodawano równą objętość alkoholu izopropylowego i mieszano. Mieszaninę inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 15 minut przy 12000 x g w 4°C. Supernatant odrzucano, a osad przemywano dwukrotnie 75% etanolem i wirowano przez 5 minut przy 7500 x g w 4°C.

Uzyskany osad suszono i zawieszano w 30 μ l wody wolnej od nukleaz. Stężenie oraz czystość wyizolowanego RNA oznaczano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda=260$ nm, $\lambda=280$ nm, $\lambda=230$ nm z wykorzystaniem aparatu Nanophotometer®P 360. Jakość RNA sprawdzano również poprzez rozdzielanie go w 1,5% żelu agarozowym.

6.2.5.3. Degradacja genomowego DNA

Całkowite RNA (1 μ g) oczyszczano z zanieczyszczeń genomowego DNA poprzez trawienie deoksyrybonukleazą I. Mieszaninę reakcyjną (10 μ l) inkubowano przez 30 minut w 37°C. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie do mieszaniny 1 μ l 50 mM EDTA i ogrzewanie próbki w temperaturze 65°C przez 10 minut.

6.2.5.4. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzano z wykorzystaniem aparatu CFX Connect™ Real-Time PCR Detection. Mieszanina reakcyjna (10 μ l) zawierała 10 ng cDNA, odpowiednie startery (w stężeniu 0,4 μ M każdy) oraz iTaq Universal SYBR Green Supermix. W celu wykluczenia zanieczyszczenia preparatu genomowym DNA, prowadzono kontrolną reakcję amplifikacji, stosując jako matrycę RNA, które nie zostało poddane reakcji odwrotnej transkrypcji.

Etapy reakcji PCR:

1. Wstępna denaturacja i aktywacja polimerazy: 30 sekund, 95°C;
2. Denaturacja: 5 sekund, 95°C;
3. Łączenie starterów i synteza: 30 sekund, 60°C;
4. Krzywa topnienia: od 60 do 95°C –wzrost 0,5°C co 5 sekund
5. Końcowa elongacja: 5 minut, 72°C.

Etapy 2-3 powtarzano 39 razy. Sekwencje zastosowanych starterów podano w rozdziale 6.1.4.

6.2.5.5. Reakcja PCR

Reakcję PCR przeprowadzano z wykorzystaniem termocyklera T100™ Thermal Cycler z zastosowaniem polimerazy DNA RedTaq, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Mieszanina reakcyjna o objętości 25 μ l zawierała 3,5 μ l matrycy (70 ng cDNA), po 0,5 μ M starterów F i R, 2,5 μ l 10x stężonego buforu do reakcji, 200 μ M dNTP oraz wodę wolną od nukleaz.

Etapy reakcji PCR:

1. Wstępna denaturacja: 3 minuty, 95°C;
2. Denaturacja: 30 sekund, 95°C;
3. Łączenie starterów: 60 sekund, 60°C;
4. Synteza: 60 sekund, 72°C;
5. Końcowa elongacja: 5 minut, 72°C.

Etapy 2-4 powtarzano 39 razy. Sekwencje zastosowanych starterów podano w rozdziale 6.1.4. Produkty reakcji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym w buforze TAE z dodatkiem barwnika Midori Green Advance. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w aparacie

Mini-Sub® Cell GT przy napięciu 12 V/cm. Obrazowanie w zakresie promieniowania UV przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu Gel Doc XR+System.

6.2.6. Western Blotting

6.2.6.1. Stymulacja komórek i przygotowanie lizatów

Komórki wysiewano na płytki 6-dołkowe w gęstości 1×10^6 komórek/ml w objętości 1 ml i inkubowano przez 24 godziny w atmosferze 5% CO₂ w 37°C. Następnie komórki infekowano wirusem grypy typu B (IBV) w ilości 1,5 MOI przez 2, 4 i 6 godzin lub stymulowano interferonem β (1000 U/ml) przez 15 minut. W przypadku zastosowania inhibitorów, dodawane one były na godzinę przed infekcją wirusową w stężeniach przedstawionych w rozdziale 6.1.1.1. W przypadku zastosowania przeciwciała blokującego receptor IFNAR, dodawano je na godzinę przed infekcją lub dodaniem interferonu β , w stężeniu 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszony był wirus. Po stymulacji usuwano medium z nad komórek i trzykrotnie przepłukiwano je zimnym DPBS. Lizę komórek przeprowadzano w buforze RIPA i inkubowano 30 minut na lodzie. Pobierano małe ilości próbek do pomiaru stężenia białka, a do pozostałych lizatów dodawano bufor do nanoszenia prób (3:1; v/v). Próbkę denaturowano przez 10 minut w 100°C i schładzano.

6.2.6.2. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka w badanych próbach oznaczano z zastosowaniem kwasu bityncynonowego (BCA), wykorzystując zestaw Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Na płytkę 96-dołkową naniesiono w dwóch powtórzeniach po: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 μl roztworu BSA o stężeniu 2 mg/ml oraz po 2 μl badanych próbek. Następnie dodawano 200 μl odczynnika BCA przygotowanego zgodnie z zaleceniami producenta. Płytkę inkubowano przez 30 minut w 37°C. Następnie odczytano absorbancję przy długości fali 562 nm, wykorzystując czytnik Synergy H4. Stężenie białka wyznaczano na podstawie krzywej kalibracyjnej uzyskanej z wykorzystaniem wzorcowego roztworu BSA.

6.2.6.3. Elektroforeza SDS-PAGE

Elektroforetyczny rozdział białek wraz ze standardami mas przeprowadzano w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących wg Laemmli'ego (128). Na żel nanoszono 15 μg białka. Elektroforezę prowadzono w aparacie Mini Protean w buforze elektrodowym przy napięciu 90 V do momentu odpowiedniego zagęszczenia próbek w żelu zagęszczającym, a następnie rozdział kontynuowano przy napięciu 120 V.

6.2.6.4. Elektrotransfer białek

Po rozdziale elektroforetycznym białka przenoszono na membranę nitrocelulozową z wykorzystaniem aparatu Mini Trans-Blot przez 1,5 godziny przy stałym natężeniu 200 mA.

6.2.6.5. Detekcja białek immobilizowanych na membranie nitrocelulozowej

Membranę z immobilizowanymi białkami blokowano w kazeinowym buforze blokującym przez 16 godzin w temperaturze pokojowej w celu zablokowania nieswoistych oddziaływań, a następnie płukano w TBS-T (1x10 minut) oraz TBS (2x10 minut). Wyplukane membrany inkubowano w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych w 1% hydrolizacie kazeiny w TBS-T przez 16 godzin w 4°C. Następnie powtarzano procedurę płukania w TBS-T oraz TBS, a wyplukane membrany inkubowano w temperaturze pokojowej z roztworem przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym przez godzinę. Membrany ponownie płukano, a następnie dokonywano pomiaru fluorescencji z wykorzystaniem skanera podczerwieni Odyssey CLx Imaging System.

6.2.7. Oznaczenie poziomu aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF

Oznaczenie poziomu aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF pozwoliło na zidentyfikowanie receptora RLR kluczowego w rozpoznawaniu wirusa grypy typu B w komórkach A549. Wykorzystano komórki A549-Dual, A549-Dual KO RIG-I oraz A549-Dual KO-MDA5, które ekspresjonują gen kodujący lucyferazę świetlika pod kontrolą promotorów aktywowanych przez czynniki transkrypcyjne z rodziny IRF. Poziom produkowanej przez zainfekowane komórki lucyferazy jest związany z poziomem odpowiedzi przeciwwirusowej indukowanej przez receptory z rodziny RLR. Komórki wysiano na płytki 96-dołkowe w gęstości $2,8 \times 10^5$ komórek/ml. Nanoszono 180 μ l zawiesiny komórek na dołek. Inkubowano przez 24 godziny w atmosferze 5% CO₂ w 37°C. Po 24 godzinach komórki infekowano wirusem grypy typu B. Po 24 godzinach infekcji zbierano nadsącz komórkowy i poddawano go pomiarom luminescencji z wykorzystaniem medium QUANTI-Luc. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszony był wirus. Do pomiaru luminescencji wykorzystano czytnik płytek LUMIstar Omega.

6.2.8. Oznaczanie poziomu biologicznie aktywnych interferonów typu I (Bioassay)

Poziom biologicznie aktywnych interferonów wydzielanych przez komórki A549 oznaczano metodą biologiczną (Bioassay) z wykorzystaniem linii komórkowej HEK-Blue™ IFN α/β zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki A549 WT i A549 *PELI3*^{-/-} wysiewano na płytki 6-dołkowe w gęstości 1×10^6 komórek/ml w objętości 1 ml/dołek i inkubowano przez 24 godziny w atmosferze 5% CO₂ w 37°C. Kolejnego dnia komórki infekowano wirusem grypy typu B (IBV) w ilości 1,5 MOI. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszony był wirus. W przypadku stosowania inhibitorów dodawano je na godzinę przed infekcją wirusową w stężeniach przedstawionych w rozdziale 6.1.1.1. Następnego dnia komórki HEK-Blue™ IFN α/β wysiewano w gęstości $2,8 \times 10^5$ komórek/ml. Nanoszono 180 μ l zawiesiny komórek na dołek. Następnie dodawano do nich po 20 μ l nadsączu znad infekowanych komórek i inkubowano kolejne 24 godziny. W kolejnym

kroku do 180 μ l medium QUANTI-Blue (Invivogen) naniesionego na 96-dołkową płytkę testową dodawano po 20 μ l nadsącza znad komórek HEK-Blue™ IFN α / β . Płytkę inkubowano 3h w 37°C, a następnie oznaczano poziom biologicznie aktywnych interferonów typu I poprzez pomiar absorbancji przy długości fali λ =620 nm.

6.2.9. Oznaczanie poziomu chemokiny CXCL10

Poziom wydzielanej chemokiny CXCL10 oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA przy użyciu zestawu CXCL10/IP-10 DuoSet ELISA, z wykorzystaniem robota E-LizaMat X-2, zgodnie z zaleceniami producentów. Komórki A549 wysiewano na płytkę hodowlaną w gęstości 1×10^6 komórek/ml medium hodowlanego w objętości 1 ml i inkubowano przez 24 godziny w atmosferze 5% CO₂ w 37°C. Następnego dnia komórki infekowano IBV przez 24 godziny w ilości 1,5 MOI. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszony był wirus. W przypadku zastosowania przeciwciała blokującego receptor interferonu (IFNAR ab) dodawano go na godzinę przed infekcją wirusową w stężeniu 0,5 μ g/ml. Na 96-dołkową płytkę testową nanoszono po 100 μ l przeciwciała opłaszczającego w stężeniu 2 μ g/ml i inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej. Następnie płytkę płukano 4-krotnie buforem PBS zawierającym 0,05% Tween 20 (PBS-T) i opłaszczano roztworem blokującym (1% BSA w PBS) celem uniknięcia niespecyficznego wiązania białek. Płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez godzinę, po czym powtórzono procedurę 4-krotnego płukania. Następnie na studzienki nanoszono po 100 μ l nadsącza znad komórek A549 lub standardu o określonym stężeniu (0-1000 pg/ml) i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie płytkę ponownie płukano, po czym nanoszono po 100 μ l biotynylowanych przeciwciał do detekcji (w stężeniu 20 ng/ml) i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Płytkę ponownie płukano, a następnie nanoszono po 100 μ l roztworu (1:39 v/v) streptawidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową (HRP). Po odpłukaniu niezwiązanego koniugatu inicjowano reakcję barwną poprzez dodanie na każdy dołek 100 μ l substratu dla HRP – TMB (1,35 mM tetrametylobenzydiny w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,0). Płytkę inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu do światła. Reakcję przerywano przez dodanie 50 μ l 2 N H₂SO₄, po czym mierzono absorbancję przy λ =450 nm. Stężenie CXCL10 określano na podstawie krzywej standardowej.

6.2.10. Badanie oddziaływania Pellino3 z TRAF3

Badanie oddziaływania białek Pellino3 i TRAF3 przeprowadzono metodą koimmunoprecypitacji polegającą na wyodrębnianiu kompleksów białkowych za pomocą specyficznych przeciwciał wiązanych do złoża agarozowego sprzężonego z białkiem A lub G.

6.2.10.1. Transfekcja komórek i przygotowanie lizatów

Komórki U-2 OS wysiewano na płytkę 6-dołkową w gęstości 5×10^5 komórek/ml w objętości 1 ml/dołek inkubowano przez 24 godziny w atmosferze 5% CO₂ w 37°C.

Kolejnego dnia przygotowano mieszaninę transfekcyjną w medium OPTI-MEM (o objętości 250 μ l) składającą się z plazmidów kodujących białka: Pellino3 z metką Myc (1 μ g/dołek) oraz TRAF3 z metką Flag (1 μ g/dołek). Dodatkowo w celu wyrównania ilości DNA użytego do transfekcji, dla obu wektorów ekspresyjnych sporządzono mieszaniny kontrolne zawierające 1 μ g/dołek plazmidu kodującego badane białko oraz pusty wektor (EV, 1 μ g/dołek). Następnie do mieszaniny DNA dodawano po 2 μ l odczynników Lipofectamine 3000 i P300. Mieszaninę inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej. Komórki poddawano transfekcji dodając 250 μ l mieszaniny transfekcyjnej na dołek i inkubowano 24 godziny w atmosferze 5% CO₂ w 37°C. Następnie usuwano medium znad komórek, komórki przepłukiwano buforem DPBS i poddawano lizie poprzez dodanie 100 μ l buforu HS. Płytkę inkubowano na lodzie przez 30 minut. Po tym czasie lizaty komórkowe przenoszono do probówek typu Eppendorf i wirowano przy 12 000 x g przez 5 minut. Uzyskane supernatanty poddawane były obróbce w kolejnym etapie.

6.2.10.2. Koimmunoprecypitacja

90 μ l otrzymanego supernatantu przenoszono do nowej probówki i dodawano 1 μ l przeciwciała anti-Flag lub anti-Myc. Próbkę umieszczano na rotatorze i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. 10 μ l pozostałego supernatantu stanowiło kontrolę ekspresji plazmidów (pełny lizat komórkowy). Po całonocnej inkubacji do mieszanin dodawano po 20 μ l złoża agarozowego sprzężonego z białkami A/G i inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie złoże agarozowe ze związanymi białkami płukano trzykrotnie buforem HS (1 ml) i wirowano przy 200 x g przez 1 minutę. Po ostatnim wirowaniu supernatant dokładnie zbierano i odrzucano. Do osadu dodawano 40 μ l buforu do nanoszenia prób (bufor HS zmieszany z buforem Laemmliego w stosunku 3:1, v/v). Następnie próbki denaturowano przez 10 minut w 100°C i schładzano. Próbkę krótko wirowano i nanoszono na żel poliakrylamidowy w ilości 20 μ l. Na żel nanoszono również 10 μ g pobranych wcześniej pełnych lizatów komórkowych. Detekcję białek przeprowadzano stosując technikę Western Blotting z wykorzystaniem przeciwciał anti-Flag i anti-Myc.

6.3. Badanie ubikwitynacji TRAF3

Komórki U-2 OS wysiewano na płytkę 6-dołkową w gęstości 5x10⁵ komórek/ml w objętości 1 ml/dołek inkubowano przez 24 godziny w atmosferze 5% CO₂ w 37°C. Kolejnego dnia przygotowano mieszaninę transfekcyjną w medium OPTI-MEM (o objętości 250 μ l) składającą się z plazmidów kodujących białka: Pellino3 z metką Myc, TRAF3 z metką Flag, ubikwitynę typu dzikiego (WT) z metką HA oraz ubikwitynę z mutacją w miejscu lizyny 48 (K48) z metką HA. Mieszaniny plazmidów przygotowano według Tabeli 6.3-1. Następnie do mieszaniny DNA dodawano po 2 μ l odczynników Lipofectamine 3000 i P300 (Invitrogen). Komórki poddawano transfekcji dodając 250 μ l mieszaniny transfekcyjnej na dołek. Komórki inkubowano 24 godziny w atmosferze 5% CO₂ w 37°C. Następnie usuwano medium znad komórek, komórki przepłukiwano buforem DPBS i poddawano lizie poprzez dodanie 100 μ l buforu RIPA. Płytkę inkubowano na lodzie przez 30 minut. Pobierano małe ilości próbek do

pomiaru stężenia białka, a do pozostałych lizatów dodawano bufor do nanoszenia prób (3:1; v/v). Próbki denaturowano przez 10 minut w 100°C i schładzano. Następnie próbki nanoszono na żel poliakrylamidowy w ilości 15 µg białka. Detekcję białek przeprowadzano stosując technikę Western Blotting z wykorzystaniem przeciwciał anty-Flag, anty-Myc oraz 101r (anty-HA).

Tabela 6.3-1. Skład mieszanin transfekcyjnych do badania ubiquitynacji TRAF3

	Peli3-Myc	TRAF3-Flag	Ub WT-HA	Ub K48-HA	EV
1.	-	0,25 µg	-	-	0,75 µg
2.	0,5 µg	-	-	-	0,5 µg
3.	-	0,25 µg	0,25 µg	-	0,5 µg
4.	-	0,25 µg	-	0,25 µg	0,5 µg
5.	0,5 µg	0,25 µg	-	-	0,5 µg
6.	0,5 µg	0,25 µg	0,25 µg	-	-
7.	0,5 µg	0,25 µg	-	0,25 µg	-

6.3.1. Analiza statystyczna

Wyniki przedstawione w pracy wyrażone są jako średnie arytmetyczne + odchylenie standardowe z trzech niezależnych powtórzeń. Różnice między dwoma badanymi grupami oceniano za pomocą testu t-Studenta przyjmując za istotne statystycznie wartości $p < 0,001$ (*). Analizę statystyczną oraz graficzne przedstawienie wyników wykonano za pomocą programu GraphPad Prism 7.

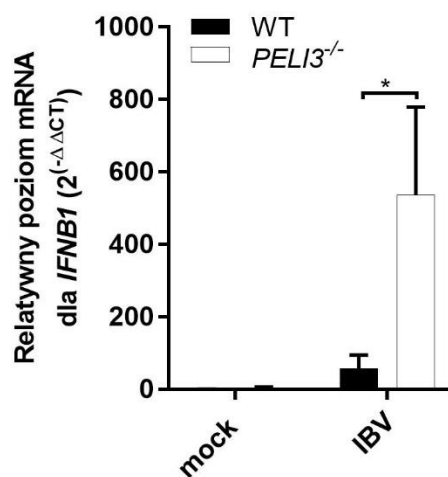
7. Wyniki

7.1. Badanie roli ligazy ubikwityny Pellino3 w produkcji interferonu typu I indukowanego podczas infekcji wirusem grypy typu B

Publikowane do tej pory badania wykazały, że ligaza ubikwityny Pellino3 jest białkiem istotnym w modulacji odpowiedzi przeciwwirusowej oraz przeciwbakteryjnej. W zależności od szlaku sygnałowego aktywowanego zakażeniem Pellino3 może pełnić rolę pozytywnego lub negatywnego regulatora odpowiedzi odpornościowej (106). Mechanizm działania tej ligazy w kontekście odpowiedzi przeciwwirusowej został dotychczas opisany w szlakach zależnych od receptorów TLR3 (127) oraz RIG-I (101) w liniach komórkowych mysich makrofagów oraz ludzkich komórkach monocytarnych. Rola Pellino3 w komórkach nabłonka, które najczęściej stanowią pierwszą linię obrony w zakażeniach wirusowych, nie została jak dotąd poznana. Z tego względu do badań wybrano nowotworową linię komórkową A549 wywodzącą się z nabłonka płuc. Jako model wirusowy wykorzystano wirusa grypy typu B, który w początkowym etapie infekcji atakuje właśnie komórki nabłonka płuc, namnażając się w nim i indukując pierwszą fazę odpowiedzi odpornościowej (129).

Interferon typu I jest kluczowym komponentem odpowiedzi odpornościowej na infekcję wirusową, dlatego w pierwszym etapie badań komórki A549 typu dzikiego (WT) oraz komórki z nokautem genu kodującego białko Pellino3 (*PELI3*^{-/-}) zainfekowano wirusem grypy typu B (IBV). Następnie metodą real-time PCR określono zmiany w ekspresji genu kodującego interferon β .

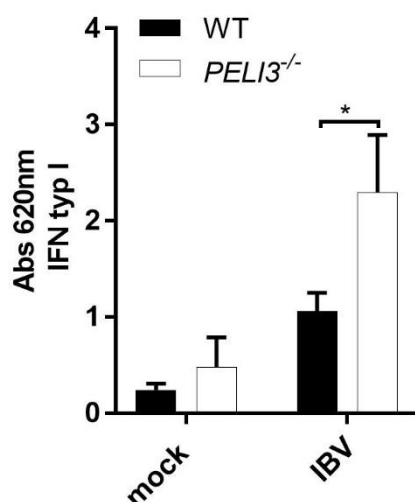
Otrzymane wyniki pokazują, że infekcja wirusem grypy typu B indukuje ekspresję genu *IFNB1* w komórkach A549, z czego w komórkach z nokautem genu *PELI3* ekspresja *IFNB1* jest 9-krotnie wyższa niż w komórkach typu dzikiego (Rysunek 7.1).



Rysunek 7.1 Poziom ekspresji genu kodującego *IFNB1* w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową. Komórki A549 typu dzikiego (WT) oraz komórki z nokautem genu Pellino3 (*PELI3*^{-/-}) infekowano IBV w ilości 1,5 MOI przez 4h. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszony był wirus (mock). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą real-time PCR oznaczano relatywny poziom ekspresji genu *IFNB1*. Jako gen referencyjny wykorzystano *HPRT1*. * $p \leq 0,001$

W kolejnym etapie sprawdzono czy dane uzyskane na poziomie transkryptu korelują z poziomem wydzielanego białka. W tym celu komórki A549 infekowano wirusem przez 24 godziny, a następnie stosując Bioassay określono poziom wydzielonych biologicznie aktywnych interferonów typu I.

Otrzymane wyniki wskazują, że komórki A549 z nokautem genu *PELI3* produkują ponad dwukrotnie więcej interferonów typu I w odpowiedzi na infekcję wirusową (Rys. 7.2). Uzyskane komplementarne wyniki sugerują, że ligaza ubikwityny Pellino3 jest negatywnym regulatorem ekspresji *IFNB1* i wydzielania interferonów typu I w odpowiedzi na infekcję wirusową w komórkach nabłonka płuc.



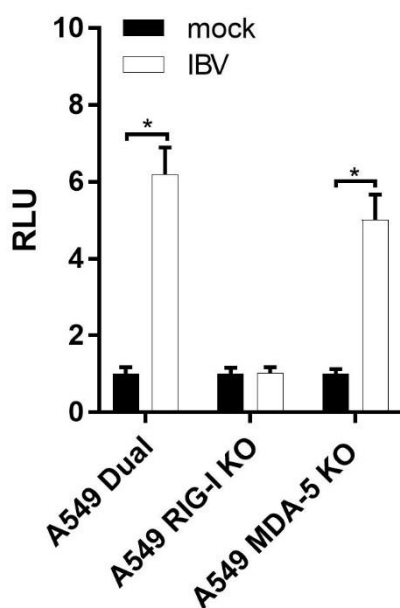
Rysunek 7.2 Poziom produkcji interferonów typu I w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową. Komórki A549 WT oraz *PELI3*^{-/-} infekowano IBV w ilości 1,5 MOI przez 24h. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznego z tym, w którym zawieszony był wirus (mock). Następnie zbierano nadsącz komórkowy, w którym analizowano poziom biologicznie aktywnych interferonów typu I metodą Bioassay. * $p \leq 0,001$

7.2. Badanie roli receptorów z rodziny RLR w odpowiedzi przeciwwirusowej indukowanej infekcją wirusem grypy typu B

W celu zbadania czy receptory z rodziny RLR odpowiedzialne są za rozpoznawanie wirusa grypy typu B oraz określenia który z tych receptorów pełni nadrzędną rolę w rozpoznawaniu IBV wykorzystano komórki A549-Dual, A549-Dual KO RIG-I oraz A549-Dual KO-MDA5. Komórki te ekspresjonują gen kodujący lucyferazę świetlika pod kontrolą promotorów aktywowanych przez czynniki transkrypcyjne z rodziny IRF. Aktywacja czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF jest kluczowym etapem pośredniczącym w indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej. Poziom produkowanej przez zainfekowane komórki lucyferazy jest więc związany z poziomem odpowiedzi przeciwwirusowej indukowanej przez receptory z rodziny RLR. Komórki infekowano IBV przez 24 godziny, a następnie zebrany nadsącz komórkowy poddano pomiarom luminescencji z wykorzystaniem medium QUANTI-Luc.

Wykazano, że w komórkach typu dzikiego (A549-Dual) oraz w komórkach z nokautem genu kodującego receptor MDA5 infekcja wirusem grypy typu B indukuje aktywację

czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF, natomiast w komórkach z nokautem genu kodującego receptor RIG-I aktywacja tych czynników nie zachodzi (Rys. 7.3), co wskazuje na udział receptora RIG-I w odpowiedzi przeciwwirusowej aktywowanej IBV.



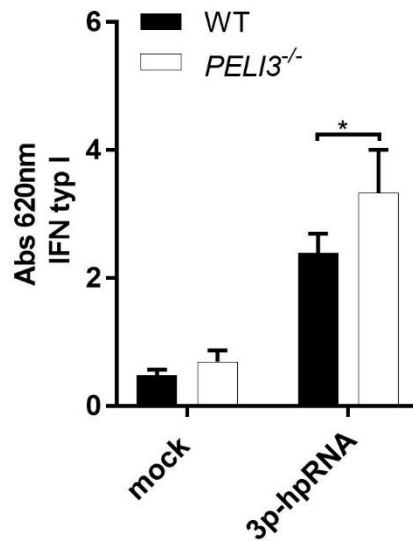
Rysunek 7.3 Aktywacja czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową. Komórki A549-Dual, A549-Dual KO-RIG-I oraz A549-Dual KO-MDA5 infekowano IBV w ilości 1,5 MOI przez 24h. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszony był wirus (mock). Następnie zebrano nadsącz komórkowy, który poddano pomiarom luminescencji z wykorzystaniem medium QUANTI-Luc.* $p \leq 0,001$

7.3. Badanie roli ligazy Pellino3 w szlaku sygnałowym zależnym od receptora RIG-I

7.3.1. Rola ligazy ubikwityny Pellino3 w produkcji interferonów typu I w odpowiedzi na stymulację receptora RIG-I

Kolejny etap badań miał na celu potwierdzenie czy obserwowane różnice w ekspresji oraz produkcji interferonów typu I indukowanych zakażeniem wirusowym (Rys 7.1 i Rys.7.2) zależne są od aktywacji receptora RIG-I. W tym celu komórki A549 typu dzikiego oraz z nokautem białka Pellino3 stymulowano specyficznym ligandem receptora RIG-I 3p-hpRNA. Po 24 godzinach stymulacji komórek, zbierano nadsącz komórkowy w którym analizowano poziom biologicznie aktywnych interferonów typu I metodą Bioassay.

Wykazano, że komórki z nokautem genu *PELLI3* produkują więcej biologicznie aktywnych interferonów typu I w odpowiedzi na stymulację ligandem receptora RIG-I (Rys. 7.4), co sugeruje, że różnice w produkcji interferonów typu I obserwowane po infekcji wirusowej wynikają z zaburzeń szlaku sygnałowego zależnego od receptora RIG-I.

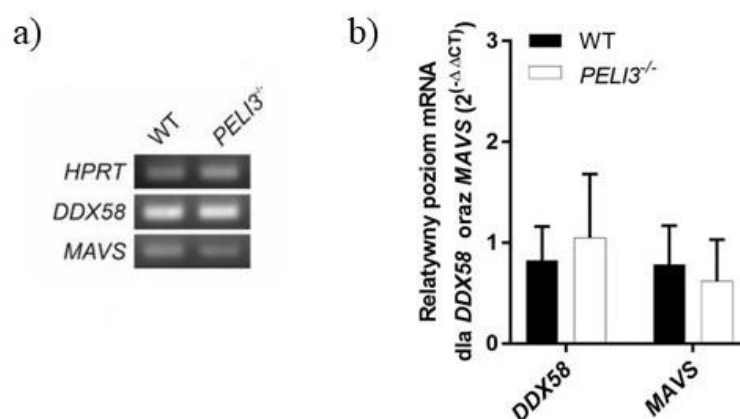


Rysunek 7.4 Poziom produkcji interferonów typu I w komórkach A549 w odpowiedzi na stymulację ligandem receptora RIG-I. A549 WT oraz *PELI3*^{-/-} transfekowano 3p-hpRNA z użyciem Lipofektaminy 3000. Po 24h zbierano nadsącz komórkowy, w którym analizowano poziom biologicznie aktywnych interferonów typu I metodą Bioassay. * $p \leq 0,001$

7.3.2. Analiza fenotypu linii komórkowej A549 typu dzikiego oraz *PELI3*^{-/-}

Kolejny etap badań miał na celu sprawdzenie, czy ekspresja receptora RIG-I oraz białka adaptorowego MAVS zależna jest od ligazy Pellino3. W tym celu przeprowadzono analizę ekspresji genów *DDX58*, *MAVS* oraz genu referencyjnego *HPRT* w komórkach typu dzikiego oraz z nokautem genu *PELI3*.

Otrzymane wyniki pokazują, że nokaut genu *PELI3* w komórkach A549 nie wpływa na poziom ekspresji receptora RIG-I jak i jego białka adaptorowego MAVS (Rys. 7.5), co pozwala wnioskować, że Pellino3 reguluje ścieżki sygnałowe znajdujące się poniżej receptora RIG-I i białka adaptorowego MAVS.

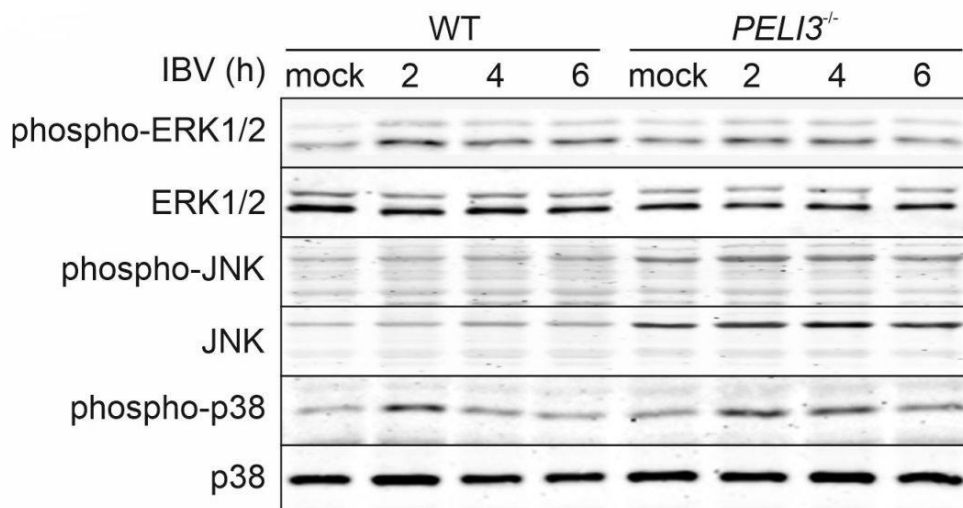


Rysunek 7.5 Analiza ekspresji genów *DDX58* oraz *MAVS* w komórkach A549 WT oraz *PELI3*^{-/-}. Z komórek A549 WT oraz *PELI3*^{-/-} wyizolowano całkowite RNA, które następnie przepisano na cDNA. a) Uzyskane cDNA wykorzystano jako matrycę do amplifikacji określonych fragmentów w klasycznej reakcji PCR. Otrzymane amplikony poddano rozdzielni elektroforetycznej w 1,5% żelu agarozowym, wykorzystując do wizualizacji Midori Green. b) Uzyskane cDNA wykorzystano jako matrycę do reakcji real-time PCR i oznaczano relatywny poziom ekspresji genów *DDX58* oraz *MAVS*. Jako gen referencyjny wykorzystano *HPRT1*.

7.4. Badanie roli ligazy Pellino3 w aktywacji wybranych MAP kinaz w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B

Celem kolejnego etapu badań było określenie ścieżek sygnałowych regulowanych przez Pellino3 w odpowiedzi na infekcję wirusową. Biorąc pod uwagę opublikowane dotychczas badania pokazujące, że ligaza Pellino3 może brać udział w modulacji ścieżek sygnałowych MAP kinaz (101, 121) przeprowadzono analizę fosforylacji wybranych kinaz białkowych z rodziny MAP w odpowiedzi na infekcję wirusem grypy typu B w komórkach A549 typu dzikiego i z nokautem genu *PELI3*. Lizaty komórkowe poddano analizie metodą Western Blotting wykorzystując przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanym formom kinaz białkowych: p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), p-JNK (Thr183/Tyr185) oraz p-p38 (Thr180/Tyr182). Fosforylację badanych kinaz oceniano w odniesieniu do całkowitej ilości badanej kinazy (ERK 1/2, JNK oraz p38).

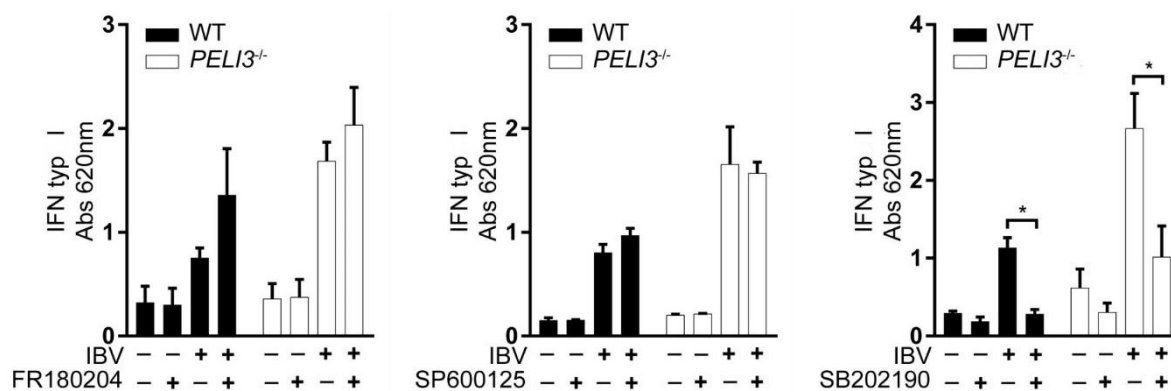
Wykazano, że w komórkach typu dzikiego i w komórkach z nokautem genu *PELI3* dochodzi do fosforylacji kinaz ERK 1/2 oraz p38 po dwóch godzinach od infekcji komórek wirusem grypy typu B (Rys. 7.6). Nie zaobserwowano jednak wpływu ligazy Pellino3 na fosforylację tych kinaz. Otrzymane wyniki pokazują również, że w komórkach A549 nie dochodzi do fosforylacji kinaz JNK w odpowiedzi na infekcję IBV.



Rysunek 7.6 Kinytyka aktywacji MAP kinaz w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B. Komórki A549 WT i *PELI3*^{-/-} infekowano IBV w ilości 1,5 MOI. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszony był wirus (mock). Następnie przygotowywano lizaty komórkowe w wybranych punktach czasowych i mierzono w nich stężenie białka metodą BCA. Lizaty zawierające 15 µg białka poddawano elektroforezie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzano z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem (IRD800) w aparacie Odyssey CLx Imaging System LI-COR. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.

W celu potwierdzenia, że ligaza Pellino3 nie wpływa na zależną od kinaz z rodziny MAP odpowiedź przeciwwirusową, w kolejnym etapie zbadano poziom produkcji interferonów typu I w obecności lub przy braku specyficznych inhibitorów tych kinaz, odpowiednio: FR180204 dla kinaz ERK 1/2, SP600125 dla kinaz JNK oraz SB202190 dla p38.

Potwierdzono, że zahamowanie aktywności kinaz ERK 1/2 oraz JNK nie wpływa na produkcję interferonów typu I w odpowiedzi na infekcję wirusową (Rys. 7.7). Zaobserwowano natomiast, że zahamowanie aktywności kinaz p38 skutkuje obniżoną produkcją badanego białka. Spadek ten obserwowany jest jednak zarówno w komórkach typu dzikiego jak i w komórkach z nokautem genu *PELI3*. Podsumowując, przedstawione wyniki sugerują, że aktywacja kinaz ERK 1/2 jest istotnym elementem odpowiedzi przeciwwirusowej, jednak nie jest ona istotna w indukcji ekspresji interferonów typu I. Natomiast aktywność kinaz p38 wpływa na produkcję interferonu w odpowiedzi na infekcję wirusem grypy typu B. Aktywność badanych kinaz nie jest jednak regulowana przez ligazę Pellino3 w komórkach A549.



Rysunek 7.7 Poziom produkcji interferonów typu I w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową. Komórki A549 WT oraz A549 *PELI3*^{-/-} traktowano DMSO (-), FR180204 (2 μ M), SP600125 (10 μ M) lub SB20190 (5 μ M) przez 1h. Następnie infekowano IBV w ilości 1,5 MOI przez 24h, po czym zebrano nadsącz komórkowy, w którym analizowano poziom biologicznie aktywnego interferonu typu I metodą Bioassay. * $p \leq 0,001$

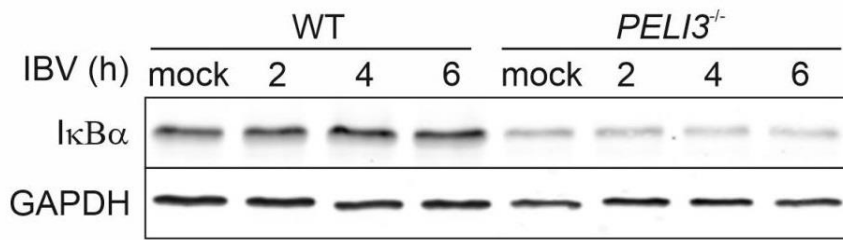
7.5. Badanie roli ligazy Pellino3 w aktywacji kluczowych dla produkcji IFN typu I czynników transkrypcyjnych

Rozpoznanie materiału wirusowego przez receptor RIG-I prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych takich jak IRF3/7 oraz NF- κ B, co w konsekwencji prowadzi do indukcji genów kodujących interferony (130). Dlatego też, w celu zidentyfikowania ścieżki sygnałowej modulowanej przez ligazę Pellino3 podczas infekcji wirusem grypy typu B w komórkach A549, w kolejnych etapach postanowiono przeanalizować aktywację czynników transkrypcyjnych, które mogą być odpowiedzialne za indukcję produkcji interferonów typu I.

7.5.1. Aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B

Kluczowym etapem w aktywacji ścieżki NF- κ B jest degradacja białka inhibitorowego I κ B α , która skutkuje uwolnieniem aktywnego dimeru podjednostek Rel i NF- κ B oraz jego translokacją do jądra komórkowego (131). Dlatego też postanowiono zbadać poziom degradacji podjednostki inhibitorowej I κ B α w trakcie infekcji IBV stosując technikę Western Blotting. Zmiany poziomu badanego białka skorelowano z całkowitą ilością białka w komórce reprezentowaną przez ilość GAPDH w lizatach komórkowych.

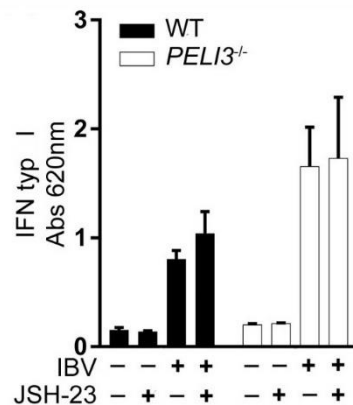
Zaobserwowano różnice w konstytutywnej ilości I κ B α w komórkach typu dzikiego w porównaniu z komórkami z nokautem genu *PELI3* (Rys. 7.8). Nie zaobserwowano jednak degradacji badanej podjednostki inhibitorowej w odpowiedzi na infekcję wirusową, co pozwala wnioskować, że podczas infekcji wirusem grypy typu B komórek A549 nie dochodzi do aktywacji ścieżki NF- κ B.



Rysunek 7.8 Degradacja IκBα w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B. Komórki A549 WT i *PELI3*^{-/-} infekowano IBV w ilości 1,5 MOI. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznego z tym, w którym zawieszony był wirus (mock). Następnie przygotowywano lizaty komórkowe w wybranych punktach czasowych i mierzono w nich stężenie białka metodą BCA. Lizaty zawierające 15 μg białka poddawano elektroforezie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzono z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem (IRD800) w aparacie Odyssey CLx Imaging System LI-COR. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń

W celu potwierdzenia, że zahamowanie translokacji czynnika NF-κB do jądra komórkowego nie wpływa na produkcję interferonów typu I w odpowiedzi na infekcję wirusową w komórkach A549, w kolejnym etapie zbadano poziom produkcji IFN typu I w obecności lub przy braku specyficznego inhibitora – JSH-23.

Potwierdzono, że zahamowanie translokacji NF-κB nie wpływa na produkcję interferonów typu I w odpowiedzi na infekcję wirusową zarówno w komórkach typu dzikiego jak i w komórkach z nokautem genu *PELI3* (Rys. 7.9), co sugeruje, że aktywacja tego szlaku nie jest wymagana do pełnej indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej podczas infekcji wirusem grypy typu B w komórkach A549.

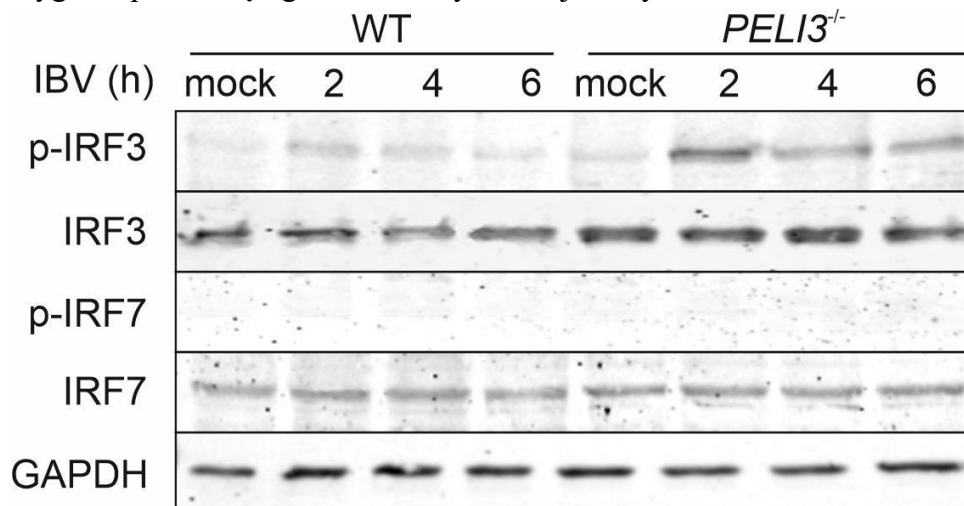


Rysunek 7.9 Poziom produkcji interferonów typu I w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową. Komórki A549 WT oraz A549 *PELI3*^{-/-} traktowano DMSO (-) lub JSH-23 (10μM) (+) przez 1h. Następnie infekowano IBV w ilości 1,5 MOI przez 24h, po czym zebrano nadsącz komórkowy, w którym analizowano poziom biologicznie aktywnego interferonu typu I metodą Bioassay

7.5.2. Aktywacja czynników regulujących interferon (IRF3/7)

Jak wynika z danych literaturowych, produkcja interferonów typu I w szlaku aktywowanym przez receptor RIG-I zależna jest od aktywacji czynników transkrypcyjnych IRF3 lub/oraz IRF7 (44). Dlatego też w kolejnym etapie badań postanowiono przeprowadzić analizę fosforylacji czynników IRF3 oraz IRF7 w trakcie infekcji wirusem grypy typu B wykorzystując technikę Western Blotting. Uzyskane wyniki skorelowano z całkowitą ilością badanych czynników transkrypcyjnych oraz z całkowitą ilością białka w komórce reprezentowaną przez ilość GAPDH w lizatach komórkowych. Wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanej formie IRF3 (Ser396) oraz IRF7 (Ser437/438).

Wykazano, że w komórkach A549 dochodzi do fosforylacji czynnika IRF3 w drugiej godzinie infekcji wirusowej, po czym fosforylacja ta słabnie w kolejnych godzinach infekcji. Zaobserwowano również silniejszą fosforylację czynnika IRF3 w komórkach z nokautem genu *PELI3* w porównaniu do komórek typu dzikiego (Rys. 7.10), co może być przyczyną zwiększonej produkcji interferonów typu I w komórkach A549 *PELI3*^{-/-}. Nie zaobserwowano natomiast sygnału pochodzącego od ufosforylowanej formy IRF7.



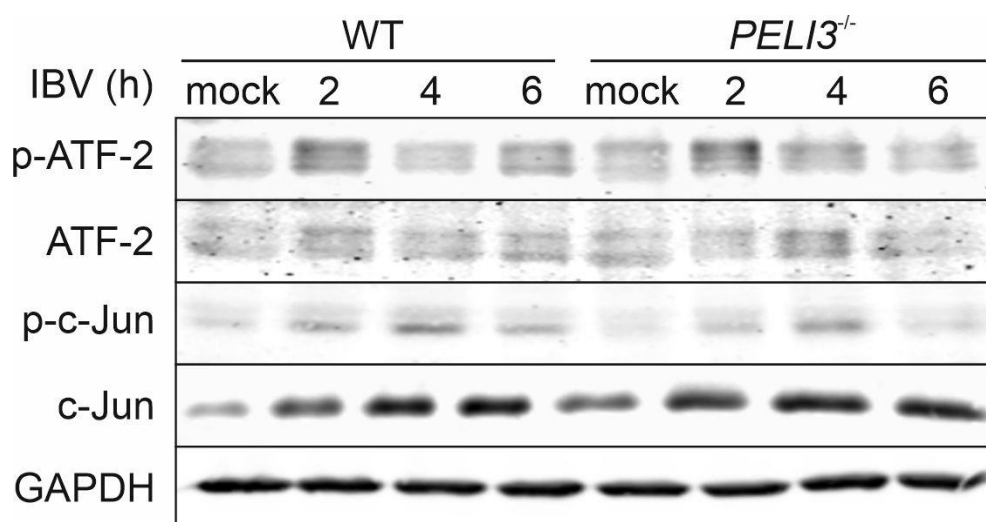
Rysunek 7.10 Fosforylacja IRF3 w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B. Komórki A549 WT i *PELI3*^{-/-} infekowano IBV w ilości 1,5 MOI. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznego z tym, w którym zawieszony był wirus (mock). Następnie przygotowywano lizaty komórkowe w wybranych punktach czasowych i mierzono w nich stężenie białka metodą BCA. Lizaty zawierające 15 µg białka poddawano elektroforezie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzano z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem (IRD800) w aparacie Odyssey CLx Imaging System LI-COR. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń

7.5.3. Aktywacja czynników należących do rodziny AP-1

Biorąc pod uwagę fakt, że produkcja interferonów typu I może być indukowana również aktywacją kompleksu AP-1, w kolejnym etapie postanowiono zbadać aktywację czynników transkrypcyjnych składających się na ten kompleks. W tym celu przeprowadzono analizę fosforylacji czynników transkrypcyjnych ATF-2 oraz c-Jun w trakcie infekcji wirusem grypy typu B wykorzystując technikę Western Blotting. Uzyskane wyniki skorelowano z całkowitą

ilością badanych czynników transkrypcyjnych oraz z całkowitą ilością białka w komórce reprezentowaną przez ilość GAPDH w lizatach komórkowych. Wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanej formie ATF-2 (Thr71) oraz c-Jun (Ser73).

Otrzymane wyniki wykazały, że w komórkach A549 dochodzi do fosforylacji czynników ATF-2 oraz c-Jun w drugiej godzinie infekcji wirusowej. Fosforylacja ATF-2 słabnie w kolejnych godzinach infekcji, podczas gdy poziom fosforylacji c-Jun osiąga swoje maksimum w czwartej godzinie infekcji (Rys. 7.11). Zaobserwowano również wzrost całkowitej ilości czynnika c-Jun w trakcie infekcji wirusowej. Zarówno fosforylacja ATF-2 i c-Jun oraz wzrost całkowitej ilości c-Jun obserwowany jest na podobnym poziomie w komórkach typu dzikiego jak i w komórkach z nokautem genu *PELI3*. Otrzymane wyniki sugerują, że aktywacja czynników transkrypcyjnych AP-1 jest istotna dla produkcji interferonów typu I w komórkach A549, jednakże nokaut genu *PELI3* nie wpływa na poziom aktywacji czynników z rodziny AP-1 w tych komórkach.



Rysunek 7.11 Fosforylacja czynników transkrypcyjnych AP-1 w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B. Komórki A549 WT i *PELI3*^{-/-} infekowano IBV w ilości 1,5 MOI. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznego z tym, w którym zawieszony był wirus (mock). Następnie przygotowywano lizaty komórkowe w wybranych punktach czasowych i mierzono w nich stężenie białka metodą BCA. Lizaty zawierające 15 µg białka poddawano elektroforezie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzono z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem (IRD800) w aparacie Odyssey CLx Imaging System LI-COR. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń

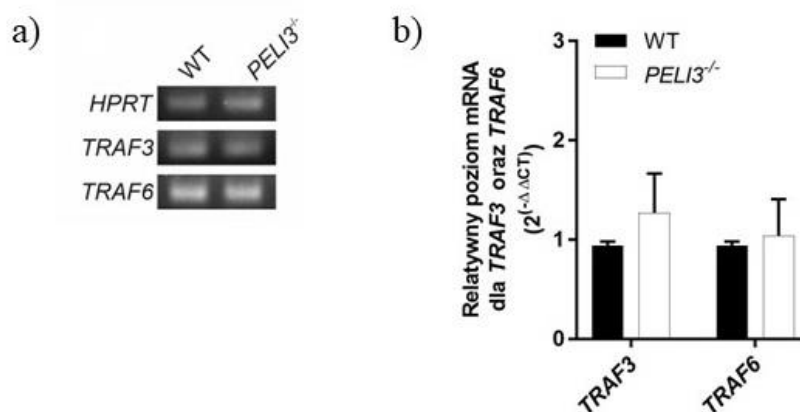
7.6. Badanie wpływu ligazy Pellino3 na poziom czynników związanych z receptorem TNF – TRAF3 oraz TRAF6

Uzyskane dotychczas wyniki sugerują, że ligaza Pellino3 negatywnie reguluje aktywację czynnika transkrypcyjnego IRF3, co skutkuje zahamowaniem produkcji interferonów typu I w odpowiedzi na infekcję wirusową. Z danych literaturowych wynika, że w ścieżce sygnałowej aktywowanej przez receptor RIG-I zaktywowane białko adaptorowe MAVS oddziałuje z białkami z rodziny TRAF, co indukuje uruchomienie kaskad sygnałowych

odpowiedzialnych za produkcję cytokin prozapalnych oraz interferonów (132). Aktywacja czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF zależna jest od ich oddziaływania z białkami z rodziny TRAF. W związku z tym w kolejnych etapach postanowiono sprawdzić, czy ligaza Pellino3 reguluje odpowiedź przeciwwirusową na poziomie białek z rodziny TRAF.

7.6.1. Analiza poziomu czynników TRAF3 oraz TRAF6 w komórkach A549

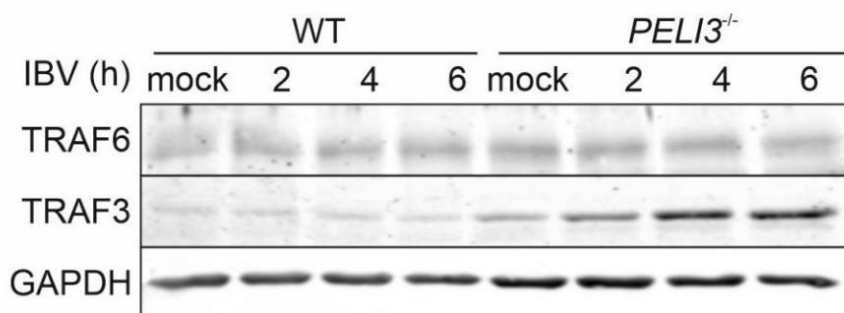
W pierwszym etapie postanowiono przeanalizować profil ekspresji TRAF3 oraz TRAF6 w komórkach A549 typu dzikiego oraz w komórkach z nokautem genu *PELI3*. Otrzymane wyniki wykazały, że w komórkach A549 WT i *PELI3*^{-/-} nie występują różnice w ekspresji genów kodujących czynniki TRAF3 oraz TRAF6 (Rys. 7.12).



Rysunek 7.12 Analiza ekspresji genów TRAF3 oraz TRAF6 w komórkach A549 WT oraz *PELI3*^{-/-}. Z komórek A549 WT oraz *PELI3*^{-/-} wyizolowano całkowite RNA, które następnie przepisano na cDNA. a) Uzyskane cDNA wykorzystano jako matrycę do amplifikacji określonych fragmentów w klasycznej reakcji PCR. Otrzymane amplicony poddano rozdzielni elektroforetycznemu w 1,5% żelu agarozowym, wykorzystując do wizualizacji Midori Green. b) Uzyskane cDNA wykorzystano jako matrycę do reakcji real-time PCR i oznaczano relatywny poziom ekspresji genów *TRAF3* oraz *TRAF6*. Jako gen referencyjny wykorzystano *HPRT1*

Pellino3, jako ligaza ubikwityny, katalizując ubikwitynację białek może przyczyniać się do ich proteasomalnej degradacji, dlatego w kolejnym etapie badań postanowiono przeanalizować poziom białek TRAF3 oraz TRAF6 w trakcie infekcji wirusem grypy typu B wykorzystując technikę Western Blotting. Wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko TRAF3 oraz TRAF6, a uzyskane wyniki skorelowano z całkowitą ilością białka w komórce reprezentowaną przez ilość GAPDH w lizatach komórkowych.

Otrzymane wyniki wykazały, że w komórkach A549 WT i *PELI3*^{-/-} poziom białka TRAF6 utrzymuje się na równym poziomie w trakcie infekcji wirusowej i jest taki sam w obu typach komórek (Rys. 7.13). Wykazano natomiast, że poziom białka TRAF3 zwiększa się w trakcie infekcji wirusem grypy typu B w komórkach z nokautem genu *PELI3*, podczas gdy w komórkach typu dzikiego utrzymuje się na tym samym poziomie. Wyniki te sugerują, że ligaza Pellino3 może przyczyniać się do regulacji poziomu TRAF3.

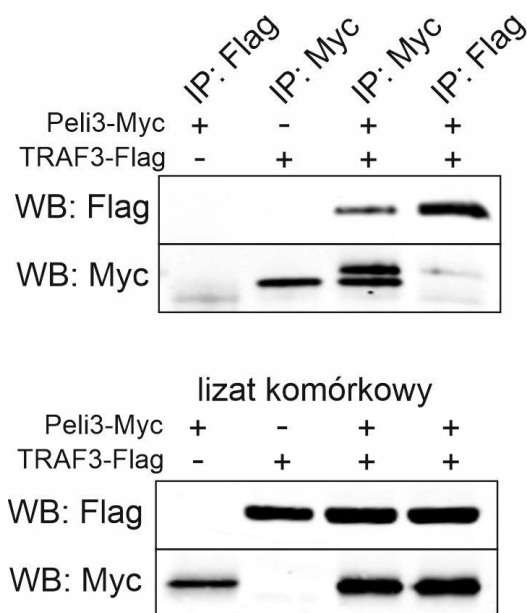


Rysunek 7.13 Analiza poziomu białek TRAF3 oraz TRAF6 w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B. Komórki A549 WT i *PELI3*^{-/-} infekowano IBV w ilości 1,5 MOI. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznego z tym, w którym zawieszony był wirus (mock). Następnie przygotowywano lizaty komórkowe w wybranych punktach czasowych i mierzono w nich stężenie białka metodą BCA. Lizaty zawierające 15 µg białka poddawano elektroforezie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzano z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem (IRD800) w aparacie Odyssey CLx Imaging System LI-COR. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń

7.6.2. Badanie oddziaływania ligazy Pellino3 z TRAF3

Biorąc pod uwagę otrzymane dotychczas wyniki sugerujące, że ligaza Pellino3 może przyczyniać się do degradacji TRAF3 w kolejnym etapie postanowiono zbadać, czy Pellino3 wchodzi w interakcję z TRAF3 wykorzystując metodę koimmunoprecypitacji. W tym celu komórki U-2 OS kotransfekowano wektorami kodującymi badane białka. Następnie z lizatów komórkowych immunoprecypitowano białka Pellino3-Myc lub TRAF3-Flag stosując przeciwciała specyficzne względem prezentowanych przez badane białka metek (Myc lub Flag).

Zaobserwowano, że białko Pellino3 ulega immunoprecypitacji z białkiem TRAF3 (Rys. 7.14). Wynik ten sugeruje, że ligaza Pellino3 może bezpośrednio oddziaływać z TRAF3, przyczyniając się do jego ubikwitynacji i proteasomalnej degradacji.

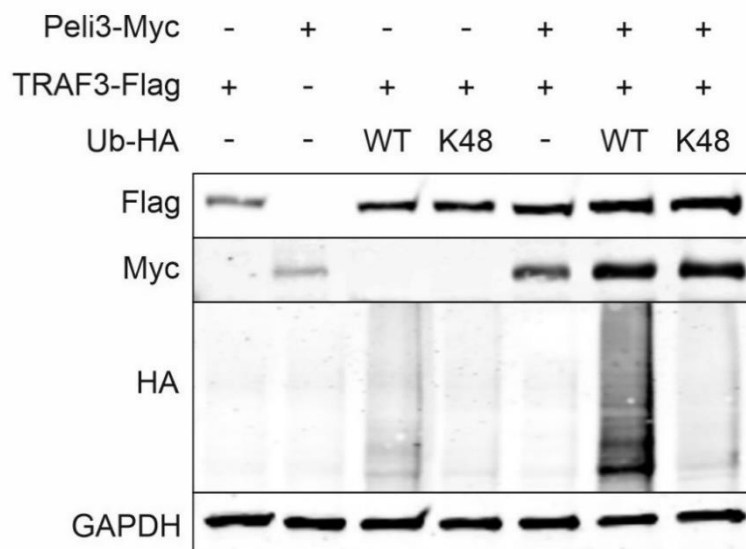


Rysunek 7.14 Koimmunoprecypitacja białek Pellino3 i TRAF3. Komórki U-2 OS kotransfekowano konstrukcjami zawierającymi gen kodujący białko Pellino3 z metką Myc lub TRAF3 z metką Flag. Po 24 godzinach hodowli komórki poddawano lizie i przeprowadzono immunoprecypitację białek z użyciem przeciwciał anti-Myc lub anti-Flag. W celu wykrycia badanych białek lizaty komórkowe oraz immunoprecypitaty poddawano elektroforezie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzono z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem (IRD800) w aparacie Odyssey CLx Imaging System LI-COR. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń

7.6.3. Analiza ubikwitinacji TRAF3 przez ligazę Pellino3

Po potwierdzeniu interakcji pomiędzy ligazą Pellino3 i TRAF3 w kolejnym etapie postanowiono zbadać profil ubikwitinacji TRAF3 przez ligazę Pellino3. Przyłączane reszty ubikwityny tworzą łańcuch poliubikwityny, który może być liniowy lub rozgałęziony. Rozgałęzienia tworzone w miejscu lizyny 48 (K48) kierują białko docelowe do degradacji (133). Dlatego też w eksperymencie wykorzystano konstrukty kodujące ubikwitynę typu dzikiego (WT) oraz ubikwitynę z mutacją w miejscu lizyny 48 (K48). Aby określić profil ubikwitinacji czynnika TRAF3, komórki U-2 OS kotransfekowano wektorami kodującymi badane białka i wektorami kodującymi ubikwitynę (WT) lub ubikwitynę (K48) z metką HA. Następnie wykorzystując technikę Western blotting badano profil ubikwitinacji wykorzystując przeciwciało skierowane przeciwko metce HA.

Otrzymane wyniki wykazały, że transfekcja komórek konstruktem kodującym ubikwitynę typu dzikiego powoduje zwiększoną ubikwitinację TRAF3, podczas gdy transfekcja konstruktem kodującym ubikwitynę K48 skutkuje obniżoną ubikwitinacją TRAF3 w porównaniu do ubikwityny WT (Rys. 7.15). Zaobserwowano również, że transfekcja komórek konstruktem kodującym Pellino3 zwiększa ubikwitinację badanego białka. Uzyskane wyniki sugerują zatem, że ligaza Pellino3 katalizuje tworzenie łańcucha poliubikwityny z rozgałęzieniami K48 na białku TRAF3, co przyczynia się do jego proteasomalnej degradacji.

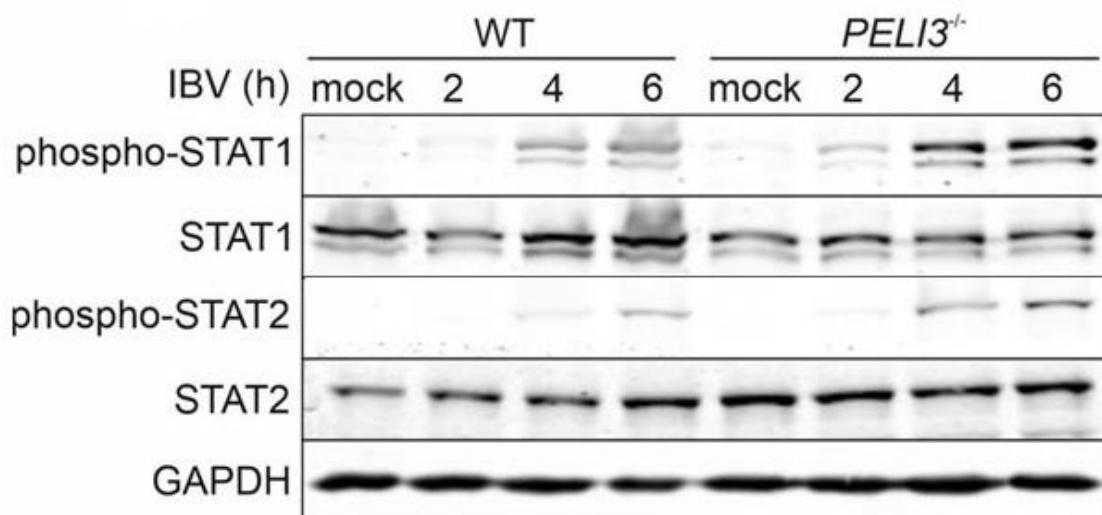


Rysunek 7.15 Profil ubikwitynacji czynnik TRAF3. Komórki U-2 OS kotransfekowano konstruktami zawierającymi gen kodujący białko Pellino3 z metką Myc lub TRAF3 z metką Flag oraz ubikwityną WT lub ubikwityną K48 z metką HA. Po 24 godzinach hodowli przygotowano lizaty komórkowe i mierzono w nich stężenie białka metodą BCA. Lizaty zawierające 15 µg białka poddawano elektroforezie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzono z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem (IRD800) w aparacie Odyssey CLx Imaging System LI-COR. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń

7.7. Badanie wpływu ligazy Pellino3 na aktywację czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT podczas infekcji wirusowej

W kolejnym etapie badań postanowiono zbadać wpływ ligazy Pellino3 na inne aspekty odpowiedzi przeciwwirusowej indukowane produkcją interferonów typu I. Wydzielane podczas infekcji wirusowej interferony typu I rozpoznawane są przez receptor dla IFN typu I, co prowadzi do aktywacji kolejnych szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za odpowiedź przeciwwirusową. W kanonicznej ścieżce rozpoznanie interferonu typu I przez receptor skutkuje aktywacją kinaz TYK2 oraz JAK1, prowadząc do fosforylacji czynników transkrypcyjnych STAT1 oraz STAT2 (134). Dlatego też, w kolejnym etapie przeprowadzono analizę fosforylacji czynników transkrypcyjnych STAT1 oraz STAT2 w trakcie infekcji wirusem grypy typu B wykorzystując technikę Western Blotting. Uzyskane wyniki skorelowano z całkowitą ilością badanych czynników transkrypcyjnych oraz z całkowitą ilością białka w komórce reprezentowaną przez ilość GAPDH w lizatach komórkowych. Wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanej formie STAT1 (Tyr701) oraz STAT2 (Tyr690).

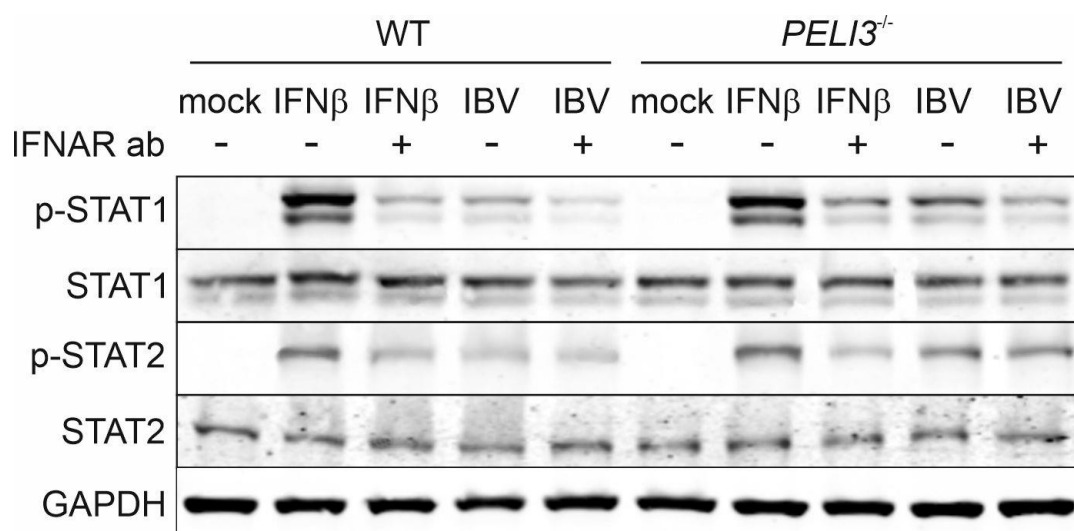
Otrzymane wyniki wykazały zwiększoną fosforylację czynników transkrypcyjnych STAT1 oraz STAT2 w komórkach z nokautem genu *PELI3* w porównaniu do komórek typu dzikiego (Rys. 7.16), co może być skutkiem zwiększonej produkcji interferonów typu I w komórkach A549 *PELI3*^{-/-}.



Rysunek 7.16 Fosforylacja czynników transkrypcyjnych STAT1 oraz STAT2 w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B. Komórki A549 WT i *PELI3*^{-/-} infekowano IBV w ilości 1,5 MOI. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznego z tym, w którym zawieszony był wirus (mock). Następnie przygotowywano lizaty komórkowe w wybranych punktach czasowych i mierzono w nich stężenie białka metodą BCA. Lizaty zawierające 15 µg białka poddawano elektroforezie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzano z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem (IRD700) w aparacie Odyssey CLx Imaging System LI-COR. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń

W celu sprawdzenia, czy obserwowane różnice w fosforylacji wynikają z zaburzonego wydzielania interferonów typu I w kolejnym etapie badań zastosowano przeciwciało blokujące receptor interferonu typu I (IFNAR ab) podczas infekcji wirusowej. W celu potwierdzenia blokującego działania przeciwciała IFNAR ab komórki stymulowano interferonem β (kontrola pozytywna). Następnie przeprowadzono analizę fosforylacji czynników transkrypcyjnych STAT1 oraz STAT2 wykorzystując technikę Western Blotting. Uzyskane wyniki skorelowano z całkowitą ilością badanych czynników transkrypcyjnych oraz z całkowitą ilością białka w komórce reprezentowaną przez ilość GAPDH w lizatach komórkowych. Wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanej formie STAT1 (Tyr701) oraz STAT2 (Tyr690).

Otrzymane wyniki wykazały zmniejszoną fosforylację czynników transkrypcyjnych STAT1 oraz STAT2 po zastosowaniu przeciwciała blokującego receptor interferonów typu I w komórkach stymulowanych IFN β (Rys. 7.17). Jednak w przypadku infekcji komórek wirusem IBV zablokowanie receptora IFNAR spowodowało osłabienie fosforylacji czynnika STAT1, podczas gdy fosforylacja czynnika STAT2 pozostała na tym samym poziomie. Wyniki te sugerują, że zwiększona fosforylacja STAT1 jest skutkiem zwiększonej produkcji interferonów typu I w komórkach z nokautem genu *PELI3*, natomiast czynnik transkrypcyjny STAT2 fosforylowany jest w tym wypadku na drodze niezależnej od IFN-I.

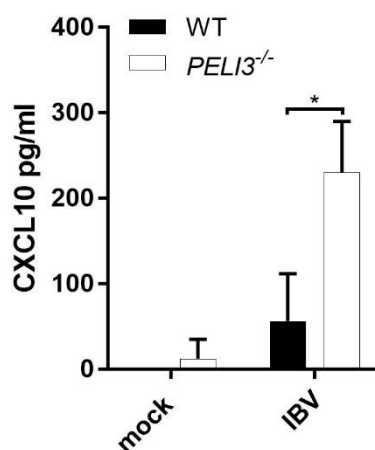


Rysunek 7.17 Fosforylacja czynników transkrypcyjnych STAT1 oraz STAT2 po zablokowaniu receptora interferonów typu I. Komórki A549 WT i *PELI3*^{-/-} infekowano IBV w ilości 1,5 MOI przez 4h lub stymulowano interferonem β przez 15 minut przy braku lub obecności przeciwciała blokującego receptor interferonów typu I (IFNAR ab). Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznego z tym, w którym zawieszony był wirus (mock). Następnie przygotowano lizaty komórkowe i mierzono w nich stężenie białka metodą BCA. Lizaty zawierające 15 μ g białka poddawano elektroforezie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzano z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem (IRD700) w aparacie Odyssey CLx Imaging System LI-COR. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń

7.8. Badanie wpływu ligazy Pellino3 na produkcję CXCL10 podczas infekcji wirusowej

Wydzielane podczas infekcji wirusowych interferony typu I mogą stymulować ekspresję innych cytokin oraz chemokin prozapalnych, takich jak CXCL10 (135). Dlatego też w kolejnym etapie badań postanowiono zbadać wpływ ligazy Pellino3 na produkcję CXCL10 podczas infekcji wirusowej, z wykorzystaniem testu ELISA.

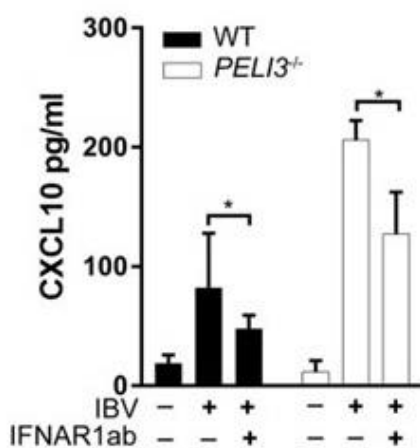
Otrzymane wyniki pokazują, że infekcja wirusem grypy typu B indukuje wydzielanie CXCL10 w komórkach A549, z czego komórki z nokautem genu *PELI3* wydzielają czterokrotnie więcej badanej chemokiny w porównaniu do komórek typu dzikiego (Rys. 7.18).



Rysunek 7.18 Poziom produkcji CXCL10 w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową. Komórki A549 WT oraz *PELI3*^{-/-} infekowano IBV w ilości 1,5 MOI przez 24h. Kontrolę negatywną stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszony był wirus (mock). Następnie zbierano nadsącz komórkowy, w którym analizowano poziom wydzielonego CXCL10 za pomocą testu ELISA. * $p \leq 0,001$

Aby potwierdzić, że obserwowane różnice w produkcji CXCL10 wynikają z zaburzonego wydzielania interferonów typu I w kolejnym etapie badań zastosowano przeciwciało blokujące receptor interferonu typu I (IFNAR ab) podczas infekcji wirusowej z wykorzystaniem testu ELISA.

Wykazano, że zastosowanie przeciwciała blokującego receptor interferonów typu I skutkuje zmniejszoną produkcją CXCL10 (Rys. 7.19), co świadczy o tym że produkcja CXCL10 zależna jest od stymulacji receptora IFNAR. Otrzymane wyniki sugerują, że obserwowana większa produkcja CXCL10 przez komórki z nokautem genu *PELI3* jest skutkiem większej ilości interferonów typu I wydzielanych przez te komórki.



Rysunek 7.19 Poziom produkcji CXCL10 w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową po zablokowaniu receptora interferonów typu I. Komórki A549 WT oraz A549 *PELI3*^{-/-} traktowano przeciwciałem blokującym receptor interferonów typu I (IFNAR ab) przez 1h. Następnie infekowano IBV w ilości 1,5 MOI przez 24h, po czym zebrano nadsącz komórkowy, w którym analizowano poziom CXCL10 za pomocą testu ELISA. * $p \leq 0,00$

8. Podsumowanie wyników

1. W komórkach nabłonka płuc ligaza Pellino3 reguluje odpowiedź przeciwwirusową indukowaną wirusem grypy typu B w szlaku zależnym od receptora RIG-I. Brak ligazy Pellino3 powoduje zwiększoną produkcję interferonów typu I w odpowiedzi na zakażenie wirusem.
2. Nokaut genu *PELLI3* nie wpływa na ekspresję genów zaangażowanych w rozpoznanie wirusa grypy typu B przez receptor RIG-I.
3. Infekcja komórek A549 wirusem grypy typu B indukuje fosforylację MAP kinaz: ERK 1/2 oraz p38, jednak aktywacja ta nie jest regulowana przez ligazę Pellino3.
4. Infekcja komórek A549 wirusem grypy typu B nie indukuje aktywacji ścieżki NF- κ B.
5. Brak ligazy Pellino3 powoduje zwiększoną aktywację czynnika transkrypcyjnego IRF3.
6. Infekcja komórek A549 wirusem grypy typu B indukuje aktywację kompleksu AP-1, jednak aktywacja czynników wchodzących w skład tego kompleksu nie jest regulowana przez ligazę Pellino3.
7. Ligaza Pellino3 katalizuje ubikwitynację czynnika TRAF3, tworząc rozgałęziony w miejscach lizyny 63 (K63) łańcuch poliubikwityny, co prowadzi do jego proteasomalnej degradacji.
8. Zaburzone wydzielanie interferonów typu I wpływa na zależną od receptora IFNAR fosforylację STAT1 i STAT2 oraz wydzielanie chemokiny CXCL10.

9. Dyskusja

Liczne doniesienia literaturowe wskazują na istotną rolę ligazy Pellino3 w regulacji wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, w tym w szlakach aktywowanych infekcją wirusową. Wykazano, że w szlaku sygnałowym receptora TLR3 aktywowanym zakażeniem wirusem EMCV aktywacja ścieżki TRIF-TBK1-IRF3 indukuje ekspresję i aktywację Pellino3, które następnie oddziałuje z TRAF6. Oddziaływanie to indukuje poliubikwitynację TRAF6, co blokuje jego możliwość interakcji z IRF7 i jego poliubikwitynacji. W konsekwencji prowadzi to do zaburzonej translokacji IRF7 do jądra komórkowego, blokując ekspresję interferonu β (127). Obserwacje te wskazują na rolę Pellino3 jako negatywnego regulatora odpowiedzi przeciwwirusowej. W szlaku zależnym od receptora RIG-I aktywowanym zakażeniem wirusem VSV Pellino3 pełni rolę pozytywnego regulatora odpowiedzi przeciwwirusowej, indukując Pellino3-zależną aktywację kinaz ERK 1/2 i ostatecznie wydzielanie białek prozapalnych takich jak interferony typu I, CXCL10, czy TNF (101).

Rola ligazy Pellino3 w infekcjach wirusowych badana była dotychczas z wykorzystaniem mysich makroflagów lub ludzkich komórek monocytarnych (101, 127). Komórki tego typu są kluczowymi komponentami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, które biorą udział w wielu fizjologicznych i patologicznych procesach, regulując rekrutację oraz aktywację limfocytów (136). Ponadto monocyty oraz makrofagi odpowiedzialne są za produkcję cytokin oraz chemokin zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną oraz inicjację procesu zapalnego (137). Badając procesy odpornościowe nie można zapomnieć jednak o komórkach nabłonkowych, które wyściełają znaczną część powierzchni ciała i jego organów, stanowiąc pierwszą linię obrony podczas infekcji (138). Infekcja komórek nabłonka skutkuje uwalnianiem przez nie cytokin i chemokin prozapalnych, co promuje rekrutację komórek immunologicznych z krwioobiegu, takich jak neutrofile czy monocyty (139). Biorąc pod uwagę różne funkcje pełnione przez komórki odpornościowe oraz komórki nabłonka, postanowiono zbadać rolę Pellino3 podczas infekcji wirusowej komórek nabłonka.

Do powszechnie występujących wirusów atakujących komórki nabłonka należą wirusy grypy. Pomimo szczepień, stanowią one wciąż poważny problem powodując choroby układu oddechowego. Postać kliniczna waha się od łagodnych objawów do ciężkiej infekcji dróg oddechowych z powikłaniami klinicznymi, takimi jak zapalenie płuc, zespół ostrej niewydolności oddechowej oraz ostre zapalenia mięśnia sercowego, co w niektórych przypadkach prowadzi do hospitalizacji i zgonów. Główną przyczyną tych infekcji są wirusy grypy typu A i B (140, 141). Chociaż uważa się, że wirusy grypy typu A stanowią większe zagrożenie pandemiczne, wirusy grypy typu B nadal stanowią istotny problem w zakażeniach sezonowych. W latach 2000-2018 wirusy grypy typu B odpowiedzialne były za 23% wszystkich zachorowań na grypę oraz za ponad połowę wszystkich zgonów związanych z grypą u dzieci (142, 143). Wirusy grypy typu B, należące do rodziny *Orthomyxoviridae* są wirusami otoczkowymi, których genom stanowi ujemnie spolaryzowane jednoniciowe RNA. W swoim cyklu życiowym wirus wiąże się z receptorami komórkowymi poprzez kwasy sjałowe występujące na glikoproteinach na powierzchni komórki i wnika do komórek głównie na drodze klatryno-zależnej endocytozy. Po odpłaszczeniu wirusa w endosomach, segmentowany

genom uwalniany jest do cytoplazmy, a następnie transportowany do jądra komórkowego, gdzie ulega transkrypcji rozpoczynając cykl replikacyjny wirusa (144).

Podczas infekcji wirusem grypy, jego tropizm do tkanki płucnej oraz zbyt silne pobudzenie nieswoistej odpowiedzi odpornościowej gospodarza może prowadzić do uszkodzenia tkanki płucnej (145). Ze względu na to, że nabłonek dróg oddechowych jest głównym punktem obrony podczas infekcji wirusem grypy, do badań wykorzystano ludzką linię komórek nabłonka podstawnego pęcherzyków płucnych A549 (129).

Pierwszą linią obrony gospodarza podczas infekcji wirusem grypy jest produkcja interferonów przez zakażone komórki (146). Kaskada indukująca wydzielanie interferonów uruchamiana jest po rozpoznaniu przez receptory komórkowe struktur molekularnych, zwanych wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (PAMP), które nie występują w niezainfekowanych komórkach (147). Wydzielane interferony stymulują następnie ekspresję wielu genów, wspólnie nazwanych genami stymulowanymi interferonem (ISGs, ang. *interferon-stimulated genes*), których ekspresja ma na celu wyeliminowanie wirusa i zapobieganie jego rozprzestrzenianiu poprzez indukcję odpowiedzi przeciwwirusowej w sąsiadujących komórkach (148). W celu zbadania wpływu ligazy Pellino3 na odpowiedź odpornościową we wczesnym stadium infekcji, w pierwszym etapie badań komórki A549 typu dzikiego oraz komórki z nokautem genu *PELI3* zainfekowano wirusem grypy typu B, a następnie przeanalizowano poziom produkowanych interferonów typu I, wykorzystując techniki real-time PCR oraz Bioassay. Otrzymane wyniki wykazały, że infekcja komórek A549 wirusem grypy indukuje ekspresję (Rys 7.1) oraz produkcję biologicznie aktywnych interferonów typu I (Rys 7.2), przy czym komórki A549 *PELI3*^{-/-} charakteryzują się silniejszą ekspresją interferonu zarówno na poziomie transkryptyu jak i na poziomie produkowanego białka. Wyniki te sugerują, że ligaza Pellino3 jest negatywnym regulatorem odpowiedzi przeciwwirusowej w komórkach nabłonka płuc po zakażeniu wirusem grypy typu B.

Podczas infekcji wirusami, których genom stanowi RNA, to właśnie wirusowe RNA jest głównym wzorcem molekularnym rozpoznawanym przez komórkę. Odpowiednie receptory zdolne są do rozpoznawania zarówno jedno- jak i dwuniciowych fragmentów RNA, które mogą być elementem genomu wirusowego lub produktem pośrednim replikacji wirusa. Wirusowe RNA może być rozpoznawane przez dwie grupy receptorów: receptory Toll-podobne (TLR) oraz receptory RIG-I-podobne (RLRs) (147). Chociaż receptory TLR7 oraz TLR3 są istotne w rozpoznawaniu materiału wirusowego, liczne badania wykazały, że w komórkach takich jak fibroblasty (149–152), czy komórki nabłonka płuc (153) to receptor RIG-I jest kluczowym receptorem koniecznym do indukcji ekspresji interferonów w odpowiedzi na zakażenie wirusowe (52). W celu potwierdzenia, czy obserwowana odpowiedź komórek A549 zależna jest od receptora RIG-I, wykorzystano komórki A549 Dual™ oraz komórki A549 Dual™ z nokautem genu *DDX58* oraz *IFIH1* (odpowiednio A549 Dual™ KO-RIG-I oraz A549 Dual™ KO-MDA5). Komórki te ekspresjonują gen kodujący lucyferazę pod kontrolą promotora ISG54 (ang. *interferon-sensitive response element 54*) oraz pięciu elementów stymulowanych interferonem (ISRE, ang. *IFN-stimulated response element*), co pozwala na badanie aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny interferonowych czynników regulacyjnych (IRFs, ang. *interferon regulatory factors*). Zaobserwowano, że infekcja wirusem grypy typu B

komórek A549 Dual™ oraz A549 Dual™ KO-MDA5 skutkuje indukcją ekspresji lucyferazy, czego nie zaobserwowano w przypadku komórek z nokautem genu *DDX58* (A549 Dual™ KO-RIG-I) (Rys 7.3), co dowodzi że receptor RIG-I jest odpowiedzialny za rozpoznawanie wirusa grypy typu B i aktywację odpowiedzi immunologicznej w komórkach A549. Dodatkowo, aby upewnić się że obserwowane różnice w produkcji interferonów typu I w komórkach typu dzikiego i w komórkach z nokautem genu *PELI3* jest zależna od receptora RIG-I, komórki te poddano stymulacji ligandem specyficznym dla tego receptora – 3p-hpRNA. Ligand ten jest 89-merowym oligonukleotydem RNA o strukturze spinki do włosów, wytworzonym poprzez transkrypcję *in vitro* sekwencji wirusa grypy A (H1N1). Wykazano, że komórki A549 *PELI3*^{-/-} produkują więcej biologicznie aktywnych interferonów typu I w odpowiedzi na stymulację ligandem (Rys. 7.4), co potwierdza, że różnice obserwowane po infekcji wirusowej wynikają z zaburzeń szlaku sygnałowego zależnego od receptora RIG-I.

Kolejne etapy pracy miały na celu ustalenie elementów szlaku sygnałowego receptora RIG-I aktywowanego infekcją wirusem grypy typu B w komórkach A549, które regulowane są przez ligazę Pellino3. W pierwszym etapie ustalono, że nokaut genu *PELI3* nie wpływa na poziom ekspresji genów kodujących RIG-I oraz białka adaptorowego MAVS (Rys 7.5)

Doniesienia literaturowe na temat ligazy Pellino3 wskazują na jej istotną rolę w regulacji aktywności kinaz aktywowanych mitogenami (MAP), takich jak p38, JNK czy ERK 1/2 (101, 104, 121). W związku z tym postanowiono przeprowadzić analizę fosforylacji wybranych MAP kinaz w odpowiedzi na infekcję komórek nabłonka płuc wirusem grypy typu B. Nie zaobserwowano fosforylacji kinaz JNK na resztach (Thr183/Tyr185) (Rys 7.6). Zaobserwowano natomiast aktywację kinaz ERK 1/2 oraz p38 w drugiej godzinie infekcji wirusowej, jednak ich fosforylacja była porównywalna w przypadku komórek A549 WT i *PELI3*^{-/-}. Otrzymane wyniki sugerują zatem, że aktywacja tych kinaz nie jest zależna od ligazy Pellino3. W celu potwierdzenia, że ligaza Pellino3 nie wpływa na zależną od MAP kinaz odpowiedź przeciwwirusową, w kolejnym etapie zbadano poziom produkcji interferonów typu I w obecności lub przy braku specyficznych inhibitorów tych kinaz, odpowiednio: FR180204 dla kinaz ERK 1/2, SP600125 dla kinaz JNK oraz SB202190 dla p38. Wykazano, że zahamowanie aktywności kinaz ERK 1/2 oraz JNK nie wpływa na produkcję interferonów typu I indukowaną zakażeniem wirusowym (Rys 7.7). Zaobserwowano natomiast, że zahamowanie aktywności kinaz p38 skutkuje obniżoną produkcją badanych białek, co jest zgodne z danymi literaturowymi (154, 155). Spadek produkcji interferonów typu I po zastosowaniu inhibitora SB202190 obserwowany jest jednak zarówno w komórkach typu dzikiego jak i w komórkach z nokautem genu *PELI3*, co sugeruje że aktywność p38 jest istotna podczas infekcji wirusowej, jednak jest ona niezależna od ligazy Pellino3. Interesujący jest fakt, że otrzymane wyniki dotyczące aktywacji kinaz ERK 1/2 odbiegają od opublikowanych wcześniej przez naszą grupę danych, gdzie fosforylacja tych kinaz indukowana zakażeniem wirusem VSV w mysich makrofagach była pozytywnie regulowana przez ligazę Pellino3, a zahamowanie aktywności ERK 1/2 skutkowało zmniejszoną produkcją interferonów typu I (101). Rozbieżności te wskazują na inny, niepoznany dotychczas mechanizm regulacji odpowiedzi przeciwwirusowej przez ligazę Pellino3 w komórkach nieimmunologicznych, jakimi są komórki nabłonka płuc.

Aktywacja receptora RIG-I po rozpoznaniu wirusowego RNA, prowadzi do jego interakcji z białkiem adaptorowym MAVS, co uruchamia kaskady sygnałowe prowadzące do aktywacji czynników transkrypcyjnych IRF3/IRF7 oraz NF- κ B, skutkując produkcją cytokin prozapalnych oraz interferonów (130). W związku z tym, w celu zidentyfikowania czynników regulowanych przez ligazę Pellino3 odpowiedzialnych za produkcję interferonów typu I w odpowiedzi na infekcję wirusem grypy, w kolejnym etapie badań postanowiono zbadać aktywację czynników IRF3/IRF7 oraz NF- κ B. Sygnał indukowany aktywacją receptora RIG-I prowadzi do fosforylacji podjednostki inhibitorowej I κ B α , a następnie jej ubikwitynacji i proteosomalnej degradacji, co skutkuje uwolnieniem aktywnych dimerów NF- κ B, ich translokacją do jądra komórkowego i w konsekwencji produkcją cytokin prozapalnych (131). Przeprowadzone badania nie potwierdziły jednak degradacji podjednostki inhibitorowej I κ B α w odpowiedzi na infekcję wirusem grypy (Rys. 7.8). Dodatkowo aby potwierdzić, że aktywacja ścieżki NF- κ B nie wpływa na wydzielanie interferonów typu I indukowaną infekcją wirusową, zbadano poziom produkcji tych białek po zastosowaniu specyficznego inhibitora NF- κ B – JSH-23, który hamuje translokację czynnika NF- κ B do jądra komórkowego. Otrzymane wyniki potwierdziły, że zahamowanie aktywności NF- κ B nie wpływa na produkcję interferonów typu I indukowaną zakażeniem wirusem grypy w komórkach A549 (Rys 7.9). Wynik ten jest zgodny z danymi literaturowymi, z których wynika że do indukcji ekspresji interferonu β konieczna jest aktywacja jedynie czynników transkrypcyjnych IRF3 oraz/lub IRF7, podczas gdy aktywacja NF- κ B czy kompleksu AP-1 nie jest wymagana (156). W związku z tym w kolejnym kroku przeprowadzono analizę fosforylacji czynników transkrypcyjnych IRF3 oraz IRF7 w odpowiedzi na infekcję wirusową. Nie zaobserwowano fosforylacji czynnika IRF7, natomiast fosforylacja IRF3 obserwowana była w drugiej godzinie infekcji (Rys. 7.10). Zaobserwowano silniejszą fosforylację czynnika IRF3 w komórkach z nokautem genu *PELLI3* w porównaniu do komórek typu dzikiego co pozwala wnioskować, że ligaza Pellino3 negatywnie reguluje aktywację czynnika transkrypcyjnego IRF3.

Aktywacja transkrypcji *IFN β* wymaga uformowania kompleksu aktywnego transkrypcyjnie (ang. *enhanceosome*), który powstaje po związaniu czynników transkrypcyjnych IRF3 lub IRF7 oraz białka HMG I(Y). W skład kompleksu mogą również wchodzić czynniki kompleksu AP-1 oraz NF- κ B (156, 157). Udział NF- κ B został wykluczony we wcześniejszych etapach pracy (Rys. 7.8 i Rys. 7.9) dlatego też, w kolejnym etapie postanowiono zbadać aktywację czynników wchodzących w skład kompleksu AP-1 – ATF-2 oraz c-Jun. W drugiej godzinie infekcji zaobserwowano fosforylację czynników ATF-2 oraz c-Jun oraz wzrost całkowitej ilości c-Jun (Rys. 7.11). Jednak zarówno fosforylacja badanych czynników jak i wzrost całkowitej ilości c-Jun obserwowane były na podobnym poziomie w komórkach z nokautem genu *PELLI3* oraz w komórkach typu dzikiego. Otrzymany wynik wskazuje, że aktywacja kompleksu AP-1 jest istotna w indukcji ekspresji interferonów typu I podczas infekcji wirusem grypy, jednak ligaza Pellino3 nie bierze udziału w regulacji aktywacji czynników transkrypcyjnych ATF-2 oraz c-Jun.

Uzyskane dotychczas wyniki sugerują, że ligaza Pellino3 odpowiada za negatywną regulację aktywacji czynnika transkrypcyjnego IRF3, czego skutkiem jest hamowanie produkcji interferonów typu I w odpowiedzi na infekcję wirusową. Planując kolejne

eksperymenty wzięto pod uwagę doniesienia literaturowe dotyczące mechanizmu aktywacji czynników IRF w następstwie infekcji wirusowej. Jak wspomniano wcześniej, opublikowane w 2012 roku badania wykazały, że ligaza Pellino3 negatywnie reguluje ekspresję interferonu β w szlaku sygnałowym receptora TLR3 poprzez zablokowanie interakcji czynnika TRAF6 z czynnikiem transkrypcyjnym IRF7 (127). Rodzina czynników związanych z receptorem TNF (TRAF) składa się z cytoplazmatycznych białek adaptorowych, które zaangażowane są w transdukcję wielu ścieżek sygnałowych zależnych od receptorów takich jak receptory Toll-podobne, receptory RIG-I-podobne czy receptory NOD-podobne. Czynniki TRAF odpowiedzialne są za aktywację czynników transkrypcyjnych takich jak NF- κ B, czynniki IRF oraz kinaz z rodziny MAP (75). Rozpoznanie wirusowego RNA przez receptor RIG-I indukuje jego oddziaływanie z białkiem adaptorowym MAVS, prowadząc do jego aktywacji. Następnie MAVS oddziałuje z białkami z rodziny TRAF co uruchamia kaskady sygnałowe odpowiedzialne za produkcję cytokin prozapalnych i interferonów (132). TRAF3 rekrutowany przez białko adaptorowe MAVS, katalizuje reakcję swojej ubikwitynacji, co prowadzi do aktywacji kinaz TBK1 oraz IKK ϵ , skutkując aktywacją czynnika transkrypcyjnego IRF3 (75). Oddziaływanie TRAF6 z białkiem adaptorowym MAVS prowadzi natomiast do aktywacji czynników transkrypcyjnych IRF7 oraz NF- κ B (77). W celu określenia, czy zaobserwowana różnica w aktywacji czynnika IRF3 wynika z zaburzeń związanych z czynnikami TRAF, przeprowadzono analizę ekspresji oraz poziomu białek TRAF3 i TRAF6. Otrzymane wyniki wykazały, że geny kodujące TRAF3 oraz TRAF6 ekspresjonowane są na tym samym poziomie w komórkach z nokautem genu *PELI3* i w komórkach typu dzikiego (Rys 7.12). Zaobserwowano, że ilość białka TRAF6 pozostawała na tym samym poziomie w trakcie infekcji wirusowej, podczas gdy ilość białka TRAF3 zwiększała się wraz z czasem infekcji w komórkach A549 *PELI3*^{-/-} (Rys. 7.13). Wyniki te sugerują, że ligaza Pellino3 może oddziaływać z TRAF3, przyczyniając się do jego degradacji w trakcie infekcji wirusowej. W kolejnym etapie, stosując metodę koimmunoprecypitacji potwierdzono bezpośrednie oddziaływanie ligazy Pellino3 z czynnikiem TRAF3 (Rys 7.14). Sugeruje to, że ligaza Pellino3 może ubikwitynować czynnik TRAF3, przyczyniając się do jego proteasomalnej degradacji, hamując aktywację IRF3 i w konsekwencji produkcję interferonów typu I.

Pellino3, jako ligaza ubikwityny E3, katalizuje reakcje przyłączania C-końcowej reszty ubikwityny do reszty lizyny białka docelowego, rozpoczynając tworzenie łańcucha poliubikwityny. Reszty lizyny K6, K11, K27, K29, K33, K48 oraz K63 występujące w cząsteczce ubikwityny mogą tworzyć siedem różnych typów rozgałęzień łańcuchów poliubikwityny. W zależności od utworzonych rozgałęzień, ubikwitynowane białko może być kierowane do degradacji przez proteasom 26S lub stanowić miejsce dokujące dla utworzenia kompleksu sygnałowego. Łańcuchy poliubikwityny tworzone przez rozgałęzienia K48 odpowiedzialne są za kierowanie białek do proteasomu 26S, prowadząc do ich degradacji (133). W celu potwierdzenia tezy, dotyczącej kierowania TRAF3 do proteasomalnej degradacji przez ligazę Pellino3, w kolejnym etapie postanowiono przeanalizować profil ubikwitynacji czynnika TRAF3. W celu określenia czy rozgałęzienia tworzone przez lizynę 48 są istotne w tworzeniu łańcucha poliubikwitynowego na białku TRAF3, komórki U-2 OS transfekowane były konstruktami kodującymi ubikwitynę typu dzikiego lub ubikwitynę z mutacją w miejscu K48

oraz konstruktem kodującym ligazę Pellino3. Wykazano, że transfekcja konstruktem kodującym ubikwitynę typu dzikiego skutkuje znacznie silniejszą ubikwitynacją TRAF3 niż w przypadku ubikwityny z mutacją w miejscu K48 (Rys. 7.15). Dodatkowo wykazano, że kotransfekcja konstruktów kodujących ubikwitynę oraz Pellino3 znacząco zwiększa obserwowaną ubikwitynację TRAF3. Otrzymanych wyniki wskazują, że ligaza Pellino3 katalizuje poliubikwitynację TRAF3 tworząc łańcuch z rozgałęzieniami K48, co przyczynia się do jego proteasomalnej degradacji. Degradacja TRAF3 prowadzi w konsekwencji do zahamowania ścieżki sygnałowej indukowanej infekcją wirusową, co skutkuje zmniejszonym wydzielaniem interferonów typu I.

Jak już wcześniej wspomniano, interferony typu I są jednymi z pierwszych cytokin produkowanych w odpowiedzi na zakażenie wirusowe. Produkcja interferonów na wczesnym etapie infekcji ma kluczowe znaczenie w indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej w zainfekowanych komórkach oraz aktywacji komórek immunologicznych, których zadaniem jest zahamowanie replikacji wirusa i aktywacji adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej (83). Kluczem przeciwwirusowej aktywności interferonów są geny stymulowane interferonem (ISGs). Do czasu pojawienia się techniki mikromacierzy sądzono, że istnieje około 30-40 ISG, z których niewielka liczba miała działanie przeciwwirusowe. Dziś wiemy, że istnieją setki genów regulowanych przez interferon, których aktywacja prowadzi do uruchomienia wielu przeciwwirusowych szlaków sygnałowych (82). Aktywacja transkrypcji ISG wymaga związania interferonów do ich receptorów występujących na powierzchni komórek. Następnie sygnał przekazywany jest przez błonę komórkową za pośrednictwem szlaku JAK-STAT, co prowadzi do szybkiej aktywacji transkrypcyjnej ISG (158).

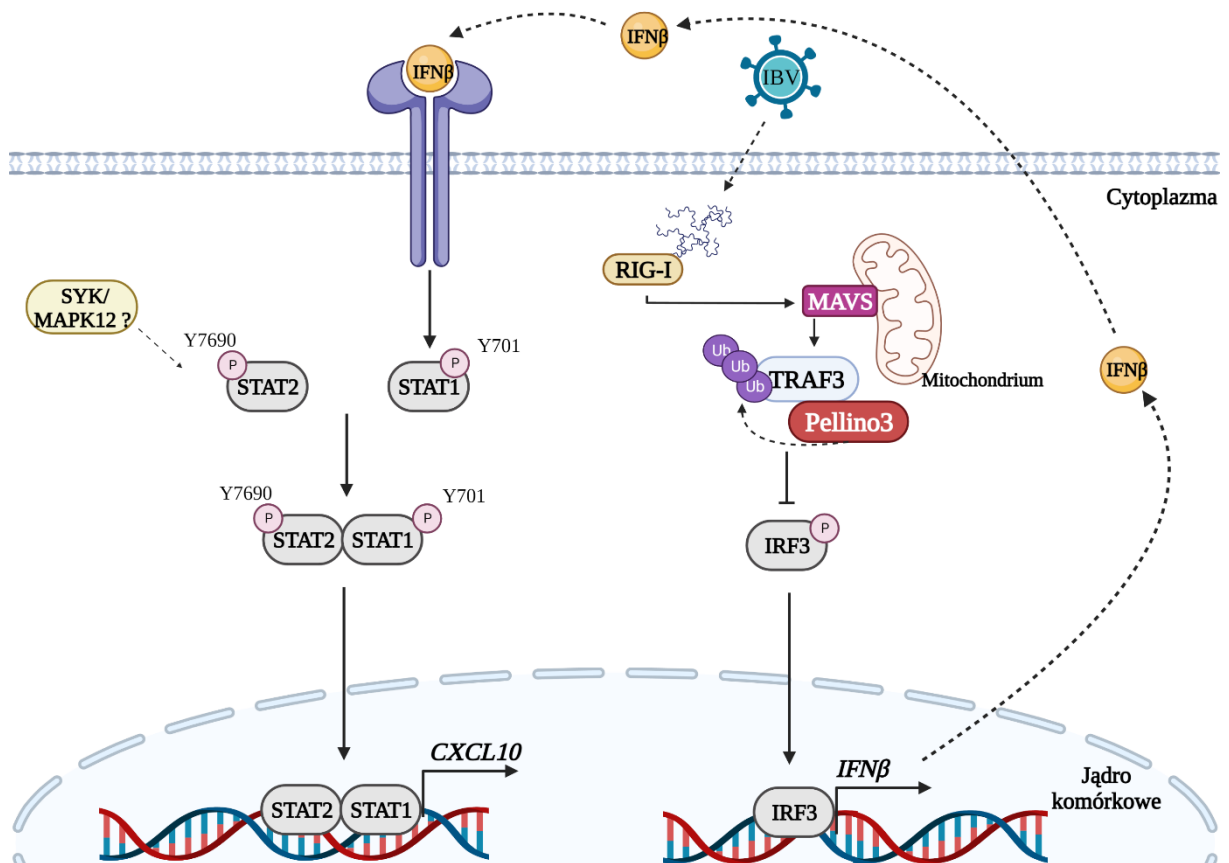
W kontekście aktywacji odpowiedzi przeciwwirusowej kluczowymi czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi na tej ścieżce są STAT1 oraz STAT2. Związanie interferonu przez receptor skutkuje aktywacją kinaz tyrozynowych JAK1 oraz TYK2, które następnie fosforylują czynniki STAT1 oraz STAT2 na określonych resztach tyrozynowych, prowadząc do powstania kompleksu ISGF3 (ang. *IFN-stimulated gene factor 3*), który jest głównym czynnikiem napędzającym transkrypcję ISG (159). Jednym z ISG istotnych w odpowiedzi przeciwwirusowej, których ekspresja zależy od interferonu typu I, jest *CXCL10*. Chemokina ta aktywuje sprzężony z białkiem G receptor chemokin CXCR3, który jest ważnym regulatorem komórek NK, NKT oraz migracji limfocytów T pomocniczych w odpowiedzi na infekcje wirusowe, choroby autoimmunologiczne i nowotwory (160). W celu sprawdzenia jak, zależna od ligazy Pellino3, produkcja interferonów typu I wpływa na inne aspekty odpowiedzi przeciwwirusowej przeprowadzono analizę fosforylacji czynników transkrypcyjnych STAT1 i STAT2 oraz produkcji chemokiny CXCL10 w odpowiedzi na infekcję wirusem grypy typu B. Wykazano, że infekcja wirusem grypy indukuje fosforylację czynników STAT1 oraz STAT2, z czego fosforylacja tych czynników jest zwiększona w komórkach z nokautem genu *PELI3* (Rys. 7.16). Zaobserwowano również, że komórki A549 *PELI3*^{-/-} produkują czterokrotnie więcej chemokiny CXCL10 w odpowiedzi na infekcję wirusową niż komórki typu dzikiego (Rys. 7.18). Zastosowanie przeciwciała blokującego receptor interferonów typu I (IFNAR ab) potwierdziło, że zarówno aktywacja STAT1 jak i produkcja CXCL10 w odpowiedzi na infekcję

wirusową zależna jest od interferonów typu I, natomiast aktywacja STAT2 zachodzi na drodze niezależnej od interferonów typu I (Rys. 7.17 i Rys 7.19). Jest to obserwacja dość nietypowa, jednak fosforylacja STAT2 niezależna od IFN-1 w odpowiedzi na wirusa grypy została już opisana przez zespół Sashy Liu w 2022 roku. Badacze wykazali, że w przypadku infekcji wirusem grypy typu A, fosforylacja STAT2 może być katalizowana przez kinazy Syk oraz MAPK12 (ang. *mitogen-activated protein kinase 12*) na drodze zależnej od kompleksu RIG-I/MAVS (161). Prawdopodobnym jest, że w przypadku infekcji wirusem grypy typu B, aktywacja STAT2 zależna jest od opisanej przez Liu ścieżki sygnałowej.

Reasumując, obserwowany w komórkach A549 *PELI3*^{-/-} podwyższony poziom fosforylacji czynnika transkrypcyjnego IRF3 (Rys. 7.10), korelujący ze zwiększonym wydzielaniem interferonów typu I (Rys. 7.2) wskazuje, że ligaza Pellino3 negatywnie reguluje odpowiedź przeciwwirusową w szlaku zależnym od receptora RIG-I (Rys. 7.3, Rys. 7.4). Analogiczną zależność zaobserwowano w szlaku receptora TLR3, gdzie ligaza Pellino3 pełniła rolę negatywnego regulatora transkrypcji genów zależnych od czynnika IRF7 (127). Co ciekawe, obserwacje dotyczące zwiększonej produkcji interferonów w komórkach z nokautem genu *PELI3* oraz brak różnic w aktywacji kinaz ERK 1/2 w wyniku infekcji wirusowej w komórkach nabłonka płuc (Rys. 7.6) odbiegają od wcześniejszych obserwacji naszego zespołu wskazującymi, że ligaza Pellino3 pozytywnie reguluje aktywację kinaz ERK 1/2 oraz produkcję cytokin w odpowiedzi na wirusa VSV w mysich makrofagach w szlaku zależnym od receptora RIG-I (101). Różnice w obserwacjach wynikać mogą z odmiennego modelu badawczego, co sugeruje, że działanie ligazy Pellino3 może być zależne od rodzaju tkanki.

Kolejne eksperymenty pozwoliły ustalić, że ligaza Pellino3 bezpośrednio oddziałuje z czynnikiem TRAF3 (Rysunek 7.14), co skutkuje jego ubikwitynacją (Rysunek 7.15) i może prowadzić do jego proteasomalnej degradacji.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pozwalają zaproponować nowy model regulacji szlaku sygnałowego zależnego od receptora RIG-I w komórkach nabłonka płuc (Rysunek 9.1). W proponowanym modelu, aktywacja receptora RIG-I przez uwolnione w cytoplazmie wirusowe RNA prowadzi do jego interakcji z białkiem adaptorowym MAVS. Ligaza Pellino3 katalizując tworzenie łańcucha poliubikwityny z rozgałęzieniami K48 na czynniku TRAF3, prowadzi do jego proteasomalnej degradacji, uniemożliwiając jego interakcję z czynnikiem IRF3 oraz jego aktywację i translokację do jądra komórkowego. Skutkiem zahamowanej translokacji IRF3 jest zahamowanie produkcji interferonów typu I. W konsekwencji zmniejszona produkcja interferonów typu I skutkuje zmniejszoną aktywacją receptora IFNAR, co z kolei prowadzi do zahamowania aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT1 i transkrypcji ISG, w tym CXCL10. W proponowanym szlaku sygnałowym ligaza Pellino3 pełni zatem rolę czynnika ograniczającego aktywację przeciwwirusowej kaskady sygnałowej, zapobiegając w ten sposób nadmiernemu pobudzeniu komórki.



Rysunek 9.1 Schemat regulacji szlaku sygnałowego receptora RIG-I aktywowanego infekcją wirusem grypy typu B w ludzkich komórkach nabłonka płuc.

10. Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że:

1. Ligaza ubikwityny Pellino3 jest negatywnym regulatorem produkcji interferonów typu I indukowanej zakażeniem wirusem grypy typu B w szlaku sygnałowym zależnym od receptora RIG-I.
2. Ligaza Pellino3 oddziałuje z czynnikiem TRAF3 i katalizuje jego ubikwitynację. Formowane łańcuchy poliubikwityny tworzą rozgałęzienia poprzez reszty lizyny 48, co prowadzi do proteasomalnej degradacji tego czynnika, hamując aktywację czynnika IRF3, a tym samym produkcję interferonów typu I.
3. Negatywna regulacja produkcji interferonów typu I przez ligazę Pellino3 wpływa na aktywację czynników transkrypcyjnych STAT1 i STAT2 oraz wydzielanie CXCL10.
4. Ligaza Pellino3 jest negatywnym regulatorem odpowiedzi przeciwwirusowej w szlaku sygnałowym zależnym od receptora RIG-I w ludzkich komórkach nabłonka płuc.

11. Spis rysunków

Rysunek 4.1 Schemat budowy receptorów TLR.....	9
Rysunek 4.2 Ligandy ludzkich receptorów TLR	10
Rysunek 4.3 Schemat szlaków sygnałowych receptorów TLR	12
Rysunek 4.4 Schemat budowy receptorów z rodziny RLR	17
Rysunek 4.5 Schemat nieaktywnej formy receptora RIG-I	18
Rysunek 4.6 Szlaki sygnałowe aktywowane przez receptory z rodziny RLR	21
Rysunek 4.7 Schemat szlaku sygnałowego receptora IFNAR	23
Rysunek 4.8 Rodzaje modyfikacji białek przez różne rodzaje rozgałęzień łańcuchów ubikwityny	24
Rysunek 4.9 Schemat budowy białek z rodziny Pellino	27
Rysunek 7.1 Poziom ekspresji genu kodującego <i>IFNBI</i> w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową.	50
Rysunek 7.2 Poziom produkcji interferonów typu I w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową.	51
Rysunek 7.3 Aktywacja czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową.	52
Rysunek 7.4 Poziom produkcji interferonów typu I w komórkach A549 w odpowiedzi na stymulację ligandem receptora RIG-I.	53
Rysunek 7.5 Analiza ekspresji genów <i>DDX58</i> oraz <i>MAVS</i> w komórkach A549 WT oraz <i>PELI3</i> ^{-/-}	54
Rysunek 7.6 Kinetyka aktywacji MAP kinaz w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B.	55
Rysunek 7.7 Poziom produkcji interferonów typu I w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową.	56
Rysunek 7.8 Degradacja IκBα w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B.	57
Rysunek 7.9 Poziom produkcji interferonów typu I w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową.	57
Rysunek 7.10 Fosforylacja IRF3 w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B.....	58
Rysunek 7.11 Fosforylacja czynników transkrypcyjnych AP-1 w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B.	59
Rysunek 7.12 Analiza ekspresji genów TRAF3 oraz TRAF6 w komórkach A549 WT oraz <i>PELI3</i> ^{-/-}	60
Rysunek 7.13 Analiza poziomu czynników TRAF3 oraz TRAF6 w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B.	61
Rysunek 7.14 Koimmunoprecypitacja białek Pellino3 i TRAF3.....	62
Rysunek 7.15 Profil ubikwitynacji czynnik TRAF3.....	63
Rysunek 7.16 Fosforylacja czynników transkrypcyjnych STAT1 oraz STAT2 w komórkach A549 po infekcji wirusem grypy typu B.	64
Rysunek 7.17 Fosforylacja czynników transkrypcyjnych STAT1 oraz STAT2 po zablokowaniu receptora interferonów typu I.	65

Rysunek 7.18 Poziom produkcji CXCL10 w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową	66
Rysunek 7.19 Poziom produkcji CXCL10 w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową po zablokowaniu receptora interferonów typu I	66
Rysunek 9.1 Schemat regulacji szlaku sygnałowego receptora RIG-I aktywowanego infekcją wirusem grypy typu B w ludzkich komórkach nabłonka płuc	75

12. Literatura

1. Janeway CA. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54:1–13.
2. Mogensen TH. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22:240–273.
3. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783–801.
4. Roh JS, Sohn DH. 2018. Origin and List of DAMPS. *Immune Netw* 18:1–14.
5. Comish PB, Carlson D, Kang R, Tang D. 2020. Damage-Associated Molecular Patterns and the Systemic Immune Consequences of Severe Thermal Injury. *J Immunol* 205:1189–1197.
6. Li D, Wu M. 2021. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 6:1–24.
7. Carty M, Guy C, Bowie AG. 2021. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. *Biochem Pharmacol* 183:114316.
8. Kawai T, Akira S. 2007. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem* 141:137–145.
9. Volchenkov R, Sprater F, Vogelsang P, Appel S. 2012. The 2011 Nobel Prize in physiology or medicine. *Scand J Immunol* 75:1–4.
10. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/Cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973–983.
11. Kawasaki T, Kawai T. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5:1–8.
12. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. 2019. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent* 43.
13. Duan T, Du Y, Xing C, Wang HY, Wang RF. 2022. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front Immunol* 13:1–22.
14. Ullah MO, Sweet MJ, Mansell A, Kellie S, Kobe B. 2016. TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *J Leukoc Biol* 100:27–45.
15. Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499–511.
16. Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373–384.
17. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. 2012. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front Immunol* 3:1–17.
18. Zheng M, Karki R, Williams EP, Yang D, Fitzpatrick E, Vogel P, Jonsson CB, Kanneganti TD. 2021. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat Immunol* 22:829–838.
19. Chen Y, Lin J, Zhao Y, Ma X, Yi H. 2021. Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B* 22:609–632.
20. Matsumoto M, Oshiumi H, Seya T. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev Med Virol* 21:67–77.
21. Chattopadhyay S, Sen GC. 2014. Tyrosine phosphorylation in Toll-like receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 25:533–541.
22. Perales-Linares R, Navas-Martin S. 2013. Toll-like receptor 3 in viral pathogenesis: Friend or foe? *Immunology* 140:153–167.
23. Vercammen E, Staal J, Beyaert R. 2008. Sensing of viral infection and activation of

- innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev* 21:13–25.
24. Schröder M, Bowie AG. 2005. TLR3 in antiviral immunity: Key player or bystander? *Trends Immunol* 26:462–468.
 25. Petes C, Odoardi N, Gee K. 2017. The Toll for trafficking: Toll-like receptor 7 delivery to the endosome. *Front Immunol* 8:1–9.
 26. Zhang Z, Ohto U, Shibata T, Krayukhina E, Taoka M, Yamauchi Y, Tanji H, Isobe T, Uchiyama S, Miyake K, Shimizu T. 2016. Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. *Immunity* 45:737–748.
 27. Kanno A, Yamamoto C, Onji M, Fukui R, Saitoh S ichiroh, Motoi Y, Shibata T, Matsumoto F, Muta T, Miyake K. 2013. Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in an intramolecular disulfide bond, proteolytic cleavage and RNA sensing. *Int Immunol* 25:413–422.
 28. Brown GJ, Cañete PF, Wang H, Medhavy A, Bones J, Roco JA, He Y, Qin Y, Cappello J, Ellyard JI, Bassett K, Shen Q, Burgio G, Zhang Y, Turnbull C, Meng X, Wu P, Cho E, Miosge LA, Andrews TD, Field MA, Tvorogov D, Lopez AF, Babon JJ, López CA, González-Murillo Á, Garulo DC, Pascual V, Levy T, Mallack EJ, Calame DG, Lotze T, Lupski JR, Ding H, Ullah TR, Walters GD, Koina ME, Cook MC, Shen N, de Lucas Collantes C, Corry B, Gantier MP, Athanasopoulos V, Vinuesa CG. 2022. TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus. *Nature* 605:349–356.
 29. Gilliet M, Conrad C, Geiges M, Cozzio A, Thürlimann W, Burg G, Nestle FO, Dummer R. 2004. Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch Dermatol* 140:1490–1495.
 30. Martínez-Espinoza I, Guerrero-Plata A. 2022. The Relevance of TLR8 in Viral Infections. *Pathogens* 11.
 31. Wang X, Chen Y, Zhang S, Deng JN. 2022. Molecular dynamics simulations reveal the selectivity mechanism of structurally similar agonists to TLR7 and TLR8. *PLoS One* 17:1–18.
 32. Tanji H, Ohto U, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. 2013. Structural reorganization of the toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science (80-)* 339:1426–1429.
 33. Ohto U, Tanji H, Shimizu T. 2014. Structure and function of toll-like receptor 8. *Microbes Infect* 16:273–282.
 34. Tanji H, Ohto U, Motoi Y, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. 2016. Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-like receptor 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:3012–3017.
 35. Tanji H, Ohto U, Shibata T, Taoka M, Yamauchi Y, Isobe T, Miyake K, Shimizu T. 2015. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol* 22:109–116.
 36. Liu J, Xu C, Hsu LC, Luo Y, Xiang R, Chuang TH. 2010. A five-amino-acid motif in the undefined region of the TLR8 ectodomain is required for species-specific ligand recognition. *Mol Immunol* 47:1083–1090.
 37. Guiducci C, Gong M, Cepika AM, Xu Z, Tripodo C, Bennett L, Crain C, Quartier P, Cush JJ, Pascual V, Coffman RL, Barrat FJ. 2013. RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *J Exp Med* 210:2903–2919.
 38. Kawasaki T, Kawai T. 2019. Discrimination Between Self and Non-Self-Nucleic Acids by the Innate Immune System *International Review of Cell and Molecular Biology*, 1st ed. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.08.004>.
 39. Ohto U, Ishida H, Shibata T, Sato R, Miyake K, Shimizu T. 2018. Toll-like Receptor 9 Contains Two DNA Binding Sites that Function Cooperatively to Promote Receptor

- Dimerization and Activation. *Immunity* 48:649-658.e4.
40. Li Y, Berke IC, Modis Y. 2012. DNA binding to proteolytically activated TLR9 is sequence-independent and enhanced by DNA curvature. *EMBO J* 31:919–931.
 41. Fukui R, Yamamoto C, Matsumoto F, Onji M, Shibata T, Murakami Y, Kanno A, Hayashi T, Tanimura N, Yoshida N, Miyake K. 2018. Cleavage of toll-like receptor 9 ectodomain is required for in vivo responses to single strand DNA. *Front Immunol* 9.
 42. Shintani Y, Kapoor A, Kaneko M, Smolenski RT, D'Acquisto F, Coppen SR, Harada-Shoji N, Lee HJ, Thiemermann C, Takashima S, Yashiro K, Suzuki K. 2013. TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:5109–5114.
 43. Huang X, Yang Y. 2010. Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. *Expert Opin Ther Targets* 14:787–796.
 44. Rehwinkel J, Gack MU. 2020. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol* 20:537–551.
 45. Leung DW, Amarasinghe GK. 2012. Structural insights into RNA recognition and activation of RIG-I-like receptors. *Curr Opin Struct Biol* 22:297–303.
 46. Brisse M, Ly H. 2019. Comparative structure and function analysis of the RIG-I-like receptors: RIG-I and MDA5. *Front Immunol* 10:1–27.
 47. Loo YM, Gale M. 2011. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* 34:680–692.
 48. Fang R, Jiang Q, Zhou X, Wang C, Guan Y, Tao J, Xi J, Feng JM, Jiang Z. 2017. MAVS activates TBK1 and IKK ϵ through TRAFs in NEMO dependent and independent manner. *PLoS Pathog* 13:1–22.
 49. Rawling DC, Pyle AM. 2014. Parts, assembly and operation of the RIG-I family of motors. *Curr Opin Struct Biol* 25:25–33.
 50. Kolakofsky D, Kowalinski E, Cusack S. 2012. A structure-based model of RIG-I activation. *Rna* 18:2118–2127.
 51. Cui S, Eisenächer K, Kirchhofer A, Brzózka K, Lammens A, Lammens K, Fujita T, Conzelmann KK, Krug A, Hopfner KP. 2008. The C-Terminal Regulatory Domain Is the RNA 5'-Triphosphate Sensor of RIG-I. *Mol Cell* 29:169–179.
 52. Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, Louber J, Brunel J, Grigorov B, Gerlier D, Cusack S. 2011. Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* 147:423–435.
 53. Liu Y, Olganier D, Lin R. 2017. Host and viral modulation of RIG-I-mediated antiviral immunity. *Front Immunol* 7:1–12.
 54. Kell AM, Gale M. 2015. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* 479–480:110–121.
 55. Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Pruijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, Schuberth C, Van Der Veen AG, Fujimura T, Rehwinkel J, Iskarpatyoti JA, Barchet W, Ludwig J, Dermody TS, Hartmann G, Reis E Sousa C. 2014. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 59-diphosphates. *Nature* 514:372–375.
 56. Schuberth-Wagner C, Ludwig J, Bruder AK, Herzner AM, Zillinger T, Goldeck M, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Kerber R, Wolter S, Stümpel JP, Roth A, Bartok E, Drosten C, Coch C, Hornung V, Barchet W, Kümmerer BM, Hartmann G, Schlee M. 2015. A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'O-Methylated Self RNA. *Immunity* 43:41–51.
 57. Devarkar SC, Schweibenz B, Wang C, Marcotrigiano J, Patel SS. 2018. RIG-I Uses an ATPase-Powered Translocation-Throttling Mechanism for Kinetic Proofreading of RNAs and Oligomerization. *Mol Cell* 72:355-368.e4.
 58. Okamoto M, Kouwaki T, Fukushima Y, Oshiumi H. 2018. Regulation of RIG-I Activation by K63-Linked Polyubiquitination. *Front Immunol* 8:6–11.

59. Lässig C, Lammens K, López JLG, Michalski S, Fettscher O, Hopfner KP. 2018. Unified mechanisms for self-RNA recognition by RIG-I singleton-merten syndrome variants. *Elife* 7:1–17.
60. Dias Junior AG, Sampaio NG, Rehwinkel J. 2019. A Balancing Act: MDA5 in Antiviral Immunity and Autoinflammation. *Trends Microbiol* 27:75–85.
61. Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN- β promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17264–17269.
62. Sampaio NG, Chauveau L, Hertzog J, Bridgeman A, Fowler G, Moonen JP, Dupont M, Russell RA, Noerenberg M, Rehwinkel J. 2021. The RNA sensor MDA5 detects SARS-CoV-2 infection. *Sci Rep* 11:1–10.
63. Yin X, Riva L, Pu Y, Martin-Sancho L, Kanamune J, Yamamoto Y, Sakai K, Gotoh S, Miorin L, De Jesus PD, Yang CC, Herbert KM, Yoh S, Hultquist JF, García-Sastre A, Chanda SK. 2021. MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep* 34.
64. Pichlmair A, Schulz O, Tan C-P, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Way M, Schiavo G, Reis e Sousa C. 2009. Activation of MDA5 Requires Higher-Order RNA Structures Generated during Virus Infection. *J Virol* 83:10761–10769.
65. Del Toro Duany Y, Wu B, Hur S. 2015. MDA5 - Filament, dynamics and disease. *Curr Opin Virol* 12:20–25.
66. Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, Chu F, Walz T, Hur S. 2013. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell* 152:276–289.
67. Duic I, Tadakuma H, Harada Y, Yamaue R, Deguchi K, Suzuki Y, Yoshimura SH, Kato H, Takeyasu K, Fujita T. 2020. Viral RNA recognition by LGP2 and MDA5, and activation of signaling through step-by-step conformational changes. *Nucleic Acids Res* 48:11664–11674.
68. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA. 2005. The RNA Helicase Lgp2 Inhibits TLR-Independent Sensing of Viral Replication by Retinoic Acid-Inducible Gene-I. *J Immunol* 175:5260–5268.
69. Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M. 2007. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-1 and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:582–587.
70. Venkataraman T, Valdes M, Elsbey R, Kakuta S, Caceres G, Saijo S, Iwakura Y, Barber GN. 2007. Loss of DExD/H Box RNA Helicase LGP2 Manifests Disparate Antiviral Responses. *J Immunol* 178:6444–6455.
71. Bruns AM, Pollpeter D, Hadizadeh N, Myong S, Marko JF, Horvath CM. 2013. ATP hydrolysis enhances RNA recognition and antiviral signal transduction by the innate immune sensor, laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). *J Biol Chem* 288:938–946.
72. Chen Y, Shi Y, Wu J, Qi N. 2021. MAVS: A Two-Sided CARD Mediating Antiviral Innate Immune Signaling and Regulating Immune Homeostasis. *Front Microbiol* 12.
73. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. 2011. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 146:448–461.
74. Paz S, Vilasco M, Werden SJ, Arguello M, Joseph-Pillai D, Zhao T, Nguyen TLA, Sun Q, Meurs EF, Lin R, Hiscott J. 2011. A functional C-terminal TRAF3-binding site in MAVS participates in positive and negative regulation of the IFN antiviral response. *Cell*

- Res 21:895–910.
75. Dhillon B, Aleithan F, Abdul-Sater Z, Abdul-Sater AA. 2019. The evolving role of TRAFs in mediating inflammatory responses. *Front Immunol* 10:1–8.
 76. Yoshida R, Takaesu G, Yoshida H, Okamoto F, Yoshioka T, Choi Y, Akira S, Kawai T, Yoshimura A, Kobayashi T. 2008. TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. *J Biol Chem* 283:36211–36220.
 77. Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, Gohda J, Akiyama T, Semba K, Goto H, Kato A, Yujiri T, Imai T, Kawaguchi Y, Su B, Takeuchi O, Akira S, Tsunetsugu-Yokota Y, Inoue JI. 2009. TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF- κ B and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA. *PLoS One* 4.
 78. Pietras EM, Cheng G. 2008. A new TRADDITION in intracellular antiviral signaling. *Sci Signal* 1:36–39.
 79. Isaacs A, Lindenmann J. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc London Ser B - Biol Sci* 147:258–267.
 80. Murira A, Lamarre A. 2016. Type-I interferon responses: From friend to foe in the battle against chronic viral infection. *Front Immunol* 7:1–8.
 81. Stanifer ML, Guo C, Doldan P, Boulant S. 2020. Importance of Type I and III Interferons at Respiratory and Intestinal Barrier Surfaces. *Front Immunol* 11:1–14.
 82. Katze MG, He Y, Gale M. 2002. Viruses and interferon: A fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2:675–687.
 83. Lee AJ, Ashkar AA. 2018. The dual nature of type I and type II interferons. *Front Immunol* 9:1–10.
 84. Teijaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KCF, Welch M, Schreiber RD, De La Torre JC, Oldstone MBA. 2013. Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science (80-)* 340:207–211.
 85. Jacquelin B, Mayau V, Targat B, Liovat AS, Kunkel D, Petitjean G, Dillies MA, Roques P, Butor C, Silvestri G, Giavedoni LD, Lebon P, Barré-Sinoussi F, Benecke A, Müller-Trutwin MC. 2009. Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J Clin Invest* 119:3544–3555.
 86. Crow MK, Ronnblom L. 2019. Type I interferons in host defence and inflammatory diseases. *Lupus Sci Med* 6:1–10.
 87. Zinngrebe J, Montinaro A, Peltzer N, Walczak H. 2014. Ubiquitin in the immune system. *EMBO Rep* 15:28–45.
 88. Hu H, Sun SC. 2016. Ubiquitin signaling in immune responses. *Cell Res* 26:457–483.
 89. Davis ME, Gack MU. 2015. Ubiquitination in the antiviral immune response. *Virology* 479–480:52–65.
 90. Yang Q, Zhao J, Chen D, Wang Y. 2021. E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. *Mol Biomed* 2.
 91. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. 2007. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446:916–920.
 92. Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. 2013. A Distinct Role of Riplet-Mediated K63-Linked Polyubiquitination of the RIG-I Repressor Domain in Human Antiviral Innate Immune Responses. *PLoS Pathog* 9.
 93. Arimoto KI, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, Shimotohno K. 2007. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7500–7505.
 94. Narayan K, Waggoner L, Pham ST, Hendricks GL, Waggoner SN, Conlon J, Wang JP, Fitzgerald KA, Kang J. 2014. TRIM13 Is a Negative Regulator of MDA5-Mediated Type I Interferon Production. *J Virol* 88:10748–10757.

95. You F, Sun H, Zhou X, Sun W, Liang S, Zhai Z, Jiang Z. 2009. PCBP2 mediates degradation of the adaptor MAVS via the HECT ubiquitin ligase AIP4. *Nat Immunol* 10:1300–1308.
96. Maelfait J, Beyaert R. 2012. Emerging Role of Ubiquitination in Antiviral RIG-I Signaling. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:33–45.
97. Li S, Wang L, Berman M, Kong YY, Dorf ME. 2011. Mapping a Dynamic Innate Immunity Protein Interaction Network Regulating Type I Interferon Production. *Immunity* 35:426–440.
98. Heissmeyer V, Krappmann D, Hatada EN, Scheidereit C. 2001. Shared Pathways of I κ B Kinase-Induced SCF β TrCP -Mediated Ubiquitination and Degradation for the NF- κ B Precursor p105 and I κ B α . *Mol Cell Biol* 21:1024–1035.
99. Cui J, Li Y, Zhu L, Liu D, Songyang Z, Wang HY, Wang RF. 2012. NLRP4 negatively regulates type I interferon signaling by targeting the kinase TBK1 for degradation via the ubiquitin ligase DTX4. *Nat Immunol* 13:387–395.
100. Yu Y, Hayward GS. 2010. The Ubiquitin E3 Ligase RAUL Negatively Regulates Type I Interferon through Ubiquitination of the Transcription Factors IRF7 and IRF3. *Immunity* 33:863–877.
101. Reniewicz P, Kula A, Makuch E, Ochnik M, Lipiński T, Siednienko J. 2021. Ligase Pellino3 Regulates Macrophage Action and Survival in Response to VSV Infection in RIG-I-Dependent Path. *Oxid Med Cell Longev* 2021.
102. Grosshans J, Schnorrer F, Nusslein-Volhard C. 1999. Oligomerisation of Tube and Pelle leads to nuclear localisation of Dorsal. *Mech Dev* 81:127–138.
103. Rich T, Allen RL, Lucas AM, Stewart A, Trowsdale J. 2000. Pellino-related sequences from *Caenorhabditis elegans* and *Homo sapiens*. *Immunogenetics* 52:145–149.
104. Jensen LE, Whitehead AS. 2003. Pellino3, a Novel Member of the Pellino Protein Family, Promotes Activation of c-Jun and Elk-1 and May Act as a Scaffolding Protein. *J Immunol* 171:1500–1506.
105. Schauvliege R, Janssens S, Beyaert R. 2006. Pellino proteins are more than scaffold proteins in TLR/IL-1R signalling: A role as novel RING E3-ubiquitin-ligases. *FEBS Lett* 580:4697–4702.
106. Moynagh PN. 2014. The roles of Pellino E3 ubiquitin ligases in immunity. *Nat Rev Immunol* 14:122–131.
107. Jiang Z, Johnson HJ, Nie H, Qin J, Bird TA, Li X. 2003. Pellino 1 is required for interleukin-1 (IL-1)-mediated signaling through its interaction with the IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-IRAK-tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) complex. *J Biol Chem* 278:10952–10956.
108. Lee YS, Kim JH, Kim ST, Kwon JY, Hong S, Kim SJ, Park SH. 2010. Smad7 and Smad6 bind to discrete regions of Pellino-1 via their MH2 domains to mediate TGF- β 1-induced negative regulation of IL-1R/TLR signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 393:836–843.
109. Choi KC, Lee YS, Lim S, Choi HK, Lee CH, Lee EK, Hong S, Kim IH, Kim SJ, Park SH. 2006. Smad6 negatively regulates interleukin 1-receptor-Toll-like receptor signaling through direct interaction with the adaptor Pellino-1. *Nat Immunol* 7:1057–1065.
110. Chang M, Jin W, Sun SC. 2009. Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nat Immunol* 10:1089–1095.
111. Bennett JA, Prince LR, Parker LC, Stokes CA, de Bruin HG, van den Berge M, Heijink IH, Whyte MK, Sabroe I. 2012. Pellino-1 Selectively Regulates Epithelial Cell Responses to Rhinovirus. *J Virol* 86:6595–6604.
112. Enesa K, Ordureau A, Smith H, Barford D, Cheung PCF, Patterson-Kane J, Arthur JSC, Cohen P. 2012. Pellino1 is required for interferon production by viral double-stranded

- RNA. *J Biol Chem* 287:34825–34835.
113. Ordureau A, Enesa K, Nanda S, Le Francois B, Peggie M, Prescott A, Albert PR, Cohen P. 2013. DEAF1 is a pellino 1-interacting protein required for interferon production by Sendai virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 288:24569–24580.
 114. Wang L, Yin C, Liu T, Abdul M, Zhou Y, Cao JL, Lu C. 2020. Pellino1 regulates neuropathic pain as well as microglial activation through the regulation of MAPK/NF- κ B signaling in the spinal cord. *J Neuroinflammation* 17:1–16.
 115. Dai D, Yuan J, Wang Y, Xu J, Mao C, Xiao Y. 2019. Peli1 controls the survival of dopaminergic neurons through modulating microglia-mediated neuroinflammation. *Sci Rep* 9:1–10.
 116. Xu J, Yu T, Pietronigro EC, Yuan J, Arioli J, Pei Y, Luo X, Ye J, Constantin G, Mao C, Xiao Y. 2020. Peli1 impairs microglial A β phagocytosis through promoting C/EBP β degradation. *PLoS Biol* 18:1–21.
 117. Yu K-Y, Kwon H-J, Norman DAM, Vig E, Goebel MG, Harrington MA. 2002. Cutting Edge: Mouse Pellino-2 Modulates IL-1 and Lipopolysaccharide Signaling. *J Immunol* 169:4075–4078.
 118. Kim TW, Yu M, Zhou H, Cui W, Wang J, DiCorleto P, Fox P, Xiao H, Li X. 2012. Pellino 2 is critical for toll-like receptor/interleukin-1 receptor (TLR/IL-1R)-mediated post-transcriptional control. *J Biol Chem* 287:25686–25695.
 119. Jensen LE, Whitehead AS. 2003. Pellino2 activates the mitogen activated protein kinase pathway. *FEBS Lett* 545:199–202.
 120. Humphries F, Bergin R, Jackson R, Delagic N, Wang B, Yang S, Dubois A V., Ingram RJ, Moynagh PN. 2018. The E3 ubiquitin ligase Pellino2 mediates priming of the NLRP3 inflammasome. *Nat Commun* 9.
 121. Butler MP, Hanly JA, Moynagh PN. 2005. Pellino3 is a novel upstream regulator of p38 MAPK and activates CREB in a p38-dependent manner. *J Biol Chem* 280:27759–27768.
 122. Yang S, Wang B, Tang LS, Siednienko J, Callanan JJ, Moynagh PN. 2013. Pellino3 targets RIP1 and regulates the pro-apoptotic effects of TNF- α . *Nat Commun* 4.
 123. Yang S, Wang B, Humphries F, Jackson R, Healy ME, Bergin R, Aviello G, Hall B, McNamara D, Darby T, Quinlan A, Shanahan F, Melgar S, Fallon PG, Moynagh PN. 2013. Pellino3 ubiquitinates RIP2 and mediates Nod2-induced signaling and protective effects in colitis. *Nat Immunol* 14:927–936.
 124. Smith SM, Freeley M, Moynagh PN, Kelleher DP. 2017. Differential modulation of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-mediated TLR2 signaling by individual Pellino proteins. *Helicobacter* 22:1–14.
 125. Murphy MB, Xiong Y, Pattabiraman G, Manavalan TT, Qiu F, Medvedev AE. 2015. Pellino-3 promotes endotoxin tolerance and acts as a negative regulator of TLR2 and TLR4 signaling. *J Leukoc Biol* 98:963–974.
 126. Tzieply N, Kuhn AM, Morbitzer D, Namgaladze D, Heeg A, Schaefer L, von Knethen A, Jensen LE, Brüne B. 2012. OxLDL inhibits LPS-induced IFN β expression by Pellino3- and IRAK1/4-dependent modification of TANK. *Cell Signal* 24:1141–1149.
 127. Siednienko J, Jackson R, Mellett M, Delagic N, Yang S, Wang B, Tang LS, Callanan JJ, Mahon BP, Moynagh PN. 2012. Pellino3 targets the IRF7 pathway and facilitates autoregulation of TLR3-and viral-induced expression of type I interferons. *Nat Immunol* 13:1055–1062.
 128. U.K. L. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
 129. Dumm RE, Fiege JK, Waring BM, Kuo CT, Langlois RA, Heaton NS. 2019. Non-lytic clearance of influenza B virus from infected cells preserves epithelial barrier function. *Nat Commun* 10:1–15.

130. Onomoto K, Onoguchi K, Yoneyama M. 2021. Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors. *Cell Mol Immunol* 18:539–555.
131. Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. 2020. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther* 5.
132. Chathuranga K, Weerawardhana A, Dodantenna N, Lee JS. 2021. Regulation of antiviral innate immune signaling and viral evasion following viral genome sensing. *Exp Mol Med* 53:1647–1668.
133. Medvedev AE, Murphy M, Zhou H, Li X. 2015. E3 ubiquitin ligases Pellinos as regulators of pattern recognition receptor signaling and immune responses. *Immunol Rev* 266:109–122.
134. Mazewski C, Perez RE, Fish EN, Platanius LC. 2020. Type I Interferon (IFN)-Regulated Activation of Canonical and Non-Canonical Signaling Pathways. *Front Immunol* 11:1–13.
135. Buttmann M, Berberich-Siebelt F, Serfling E, Rieckmann P. 2007. Interferon- β is a potent inducer of interferon regulatory factor-1/2-dependent IP-10/CXCL10 expression in primary human endothelial cells. *J Vasc Res* 44:51–60.
136. Nikitina E, Larionova I, Choinzonov E, Kzhyshkowska J. 2018. Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs. *Int J Mol Sci* 19.
137. Reece MD, Taylor RR, Song C, Gavegnano C. 2021. Targeting Macrophage Dysregulation for Viral Infections: Novel Targets for Immunomodulators. *Front Immunol* 12:1–13.
138. Günther J, Seyfert HM. 2018. The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells. *Semin Immunopathol* 40:555–565.
139. Alexander-Brett J, Holtzman MJ. 2015. Virus Infection of Airway Epithelial Cells. *Mucosal Immunol Fourth Ed* 1–2:1013–1021.
140. Chang HL, Hsu JF, Tsai YM, Lin SY, Kuo HF, Yang CJ. 2016. Acute respiratory distress syndrome and acute myocarditis developed in a previously healthy adult with influenza B. *BMC Pulm Med* 16:3–7.
141. Sellers SA, Hagan RS, Hayden FG, Fischer WA. 2017. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respi Viruses* 11:372–393.
142. Caini S, Kuszniarz G, Garate VV, Wangchuk S, Thapa B, De Paula FJ, De Almeida WAF, Njouom R, Fasce RA, Bustos P, Feng L, Peng Z, Araya JL, Bruno A, De Mora D, De Gámez MJB, Pebody R, Zambon M, Higueros R, Rivera R, Kosasih H, Castrucci MR, Bella A, Kadjo HA, Daouda C, Makusheva A, Bessonova O, Chaves SS, Emukule GO, Heraud JM, Razanajatovo NH, Barakat A, El Falaki F, Meijer A, Donker GA, Huang QS, Wood T, Balmaseda A, Palekar R, Arévalo BM, Rodrigues AP, Guiomar R, Lee VJM, Ang LW, Cohen C, Treurnicht F, Mironenko A, Holubka O, Bresee J, Brammer L, Le MTQ, Hoang PVM, El Guerche-Séblain C, Paget J. 2019. The epidemiological signature of influenza B virus and its B/Victoria and B/Yamagata lineages in the 21st century. *PLoS One* 14:1–17.
143. Zaraket H, Hurt AC, Clinch B, Barr I, Lee N. 2021. Burden of influenza B virus infection and considerations for clinical management. *Antiviral Res* 185:104970.
144. Mifsud EJ, Kuba M, Barr IG. 2021. Innate Immune Responses to Influenza Virus Infections in the Upper Respiratory Tract. *Viruses* 13.
145. Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GRS. 2015. Influenza virus-induced lung injury: Pathogenesis and implications for treatment. *Eur Respir J* 45:1463–1478.
146. Watson A, Spalluto CM, McCrae C, Cellura D, Burke H, Cunoosamy D, Freeman A, Hicks A, Hühn M, Ostridge K, Staples KJ, Vaarala O, Wilkinson T. 2020. Dynamics of

- IFN- β responses during respiratory viral infection insights for therapeutic strategies. *Am J Respir Crit Care Med* 201:83–94.
147. Killip MJ, Fodor E, Randall RE. 2015. Influenza virus activation of the interferon system. *Virus Res* 209:11–22.
 148. Wu W, Metcalf JP. 2020. The Role of Type I IFNs in Influenza: Antiviral Superheroes or Immunopathogenic Villains? *J Innate Immun* 12:437–447.
 149. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5:730–737.
 150. Westenius V, Latvala S, Diamond MS, Gale M, Julkunen I. 2015. RIG-I Signaling Is Essential for Influenza B Virus-Induced Rapid Interferon Gene Expression. *J Virol* 89:12014–12025.
 151. Loo Y-M, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, García-Sastre A, Katze MG, Gale M. 2008. Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity. *J Virol* 82:335–345.
 152. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S. 2005. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23:19–28.
 153. Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, Si-Tahar M. 2007. Cutting Edge: Influenza A Virus Activates TLR3-Dependent Inflammatory and RIG-I-Dependent Antiviral Responses in Human Lung Epithelial Cells. *J Immunol* 178:3368–3372.
 154. Hui KPY, Lee SMY, Cheung C, Ng IHY, Poon LLM, Guan Y, Ip NYY, Lau ASY, Peiris JSM. 2009. Induction of Proinflammatory Cytokines in Primary Human Macrophages by Influenza A Virus (H5N1) Is Selectively Regulated by IFN Regulatory Factor 3 and p38 MAPK. *J Immunol* 182:1088–1098.
 155. Mikkelsen SS, Jensen SB, Chiliveru S, Melchjorsen J, Julkunen I, Gaestel M, Arthur JSC, Flavell RA, Ghosh S, Paludan SR. 2009. RIG-I-mediated activation of p38 MAPK is essential for viral induction of interferon and activation of dendritic cells. Dependence on TRAF2 and TAK1. *J Biol Chem* 284:10774–10782.
 156. Randall RE, Goodbourn S. 2008. Interferons and viruses: An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89:1–47.
 157. Panne D, Maniatis T, Harrison SC. 2004. Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon- β enhancer. *EMBO J* 23:4384–4393.
 158. Wang W, Xu L, Su J, Peppelenbosch MP, Pan Q. 2017. Transcriptional Regulation of Antiviral Interferon-Stimulated Genes. *Trends Microbiol* 25:573–584.
 159. Wang Y, Song Q, Huang W, Lin Y, Wang X, Wang C, Willard B, Zhao C, Nan J, Holvey-Bates E, Wang Z, Taylor D, Yang J, Stark GR. 2021. A virus-induced conformational switch of STAT1-STAT2 dimers boosts antiviral defenses. *Cell Res* 31:206–218.
 160. Herzig DS, Luan L, Bohannon JK, Toliver-Kinsky TE, Guo Y, Sherwood ER. 2014. The role of CXCL10 in the pathogenesis of experimental septic shock. *Crit Care* 18:1–18.
 161. Li X, Liu S, Rai KR, Zhou W, Wang S, Chi X, Guo G, Chen J, Liu S. 2022. Initial activation of STAT2 induced by IAV infection is critical for innate antiviral immunity. *Front Immunol* 13:1–15.