

**INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ IM.
LUDWIKA HIRSZFELDA WE WROCŁAWIU POLSKA
AKADEMIA NAUK**

**Rola ligazy ubikwityny Pellino3 w szlaku
sygnałowym zależnym od receptora dla
interferonów typu I**

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Izabella Jasyk
Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu

**PROMOTOR:
dr hab. Jakub Siednienko**

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



NARODOWE CENTRUM NAUKI

WROCŁAW 2022

„Jeden ojciec znaczy więcej niż stu nauczycieli”

George Herbert

*Pamięci mojego Taty,
który był dla mnie w życiu największą inspiracją i motywacją.*

Chciałabym serdecznie podziękować,

Panu promotorowi dr. Jakubowi Siednienko, za zaangażowanie i merytoryczną pomoc w prowadzeniu badań,

Znajomym, których poznałam w Łukasiewicz-PORT, dr Monice Toporkiewicz i dr Justynie Mączyńskiej, za wspólne ploteczki przy kawie i ocieranie moich łez, tych ze szczęścia i tych ze smutku oraz wszystkim obecnym pracownikom Biobanku, Andrzejowi, Agacie, Beacie, Ani i Magdzie, za to, że codziennie mnie rozweselają i pomogli mi przetrwać okres pisania pracy doktorskiej,

Mojej Siostrze, Szwagrowi, Rodzinie, Przyjaciołom i Znajomym, którzy z ogromną cierpliwością wysłuchiwali moich pomysłów, narzekania i opowieści związanych z doktoratem, a także otoczyli mnie ogromnym wsparciem i wierzyli w moje możliwości nawet wtedy, kiedy sama w siebie wątpiałam.

Oraz mojej Mamie, za to, że jest.

Bez Was wszystkich ta praca nigdy by nie powstała.

Spis publikacji oraz wystąpień konferencyjnych

1. „Absence of Mal/TIRAP Results in Abrogated Imidazoquinolinones-Dependent Activation of IRF7 and Suppressed IFN β and IFN-I Activated Gene Production”. Ewa Leszczyńska, Edyta Makuch, Małgorzata Mitkiewicz, **Izabella Jasyk**, Miwako Narita, Sabina Górská, Tomasz Lipiński, Jakub Siednienko, *International Journal of Molecular Science*, 2020, 21(23), 8925. DOI: 10.3390/ijms21238925
2. „Type I interferon therapies of multiple sclerosis and hepatitis C virus infection” **Izabella Jasyk** and Jakub Siednienko, *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 2021, 75(1): 537-547. DOI:10.2478/ahem-2021-0001
3. „Role of ubiquitin ligase Pellino in neuronal disorders”. **Izabella Jasyk**, Jakub Siednienko, MONABIPHOT Summer School 2019, 23/06/2019-29/06/2019, Le Pradet, Francja

1. SPIS TREŚCI

2. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	9
3. STRESZCZENIE.....	14
4. ABSTRACT.....	16
5. WSTĘP.....	17
5.1. INTERFERONY.....	18
5.1.1. INTERFERONY TYPU I.....	19
5.1.1.1. IFNAR.....	23
5.1.1.2. SZLAKI ATYWOWANE INTERFERONAMI TYPU I.....	24
5.1.2. INTERFERON TYPU II.....	28
5.1.2.1. IFNGR.....	29
5.1.2.2. SZLAKI ATYWOWANE INTERFERONEM TYPU II.....	30
5.1.3. INTERFERONY TYPU III.....	32
5.1.3.1. IFN- λ R1 - IL-10R2.....	33
5.1.3.2. SZLAK ATYWOWANY INTERFERONAMI TYPU III	34
5.2. PELLINO.....	36
5.2.1. PELLINO1.....	37
5.2.2. PELLINO2.....	38
5.2.3. PELLINO3.....	38
6. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY.....	40
7. MATERIAŁY I METODY.....	41
7.1. MATERIAŁY.....	41
7.1.1. ODCZYNNIKI CHEMICZNE I REAGENTY.....	41
7.1.2. BUFORY.....	43
7.1.3. ZESTAWY GOTOWE.....	44
7.1.4. PRZECIWCIAŁA.....	45
7.1.5. SEKWENCJE OLIGONUKLEOTYDÓW.....	47

7.1.6.	LINIE KOMÓRKOWE.....	48
7.1.7.	APARATURA I AKCESORIA.....	49
7.1.8.	PROGRAMY KOMPUTEROWE.....	50
7.2.	METODY.....	51
7.2.1.	HODOWLA KOMÓREK.....	51
7.2.2.	STYMULACJA KOMÓREK.....	51
7.2.2.1.	PRZYGOTOWANIE KOMÓREK DO REAKCJI PCR ORAZ PCR W CZASIE RZECZYWISTYM.....	51
7.2.2.2.	PRZYGOTOWANIE KOMÓREK DO TESTU ELISA.....	52
7.2.2.3.	PRZYGOTOWANIE KOMÓREK DO WESTERN BLOTTING...	53
7.2.3.	BADANIE EKSPRESJI GENÓW.....	54
7.2.3.1.	IZOLACJA CAŁKOWITEGO RNA.....	54
7.2.3.2.	OCENA CZYSTOŚCI I POMIAR STĘŻENIA RNA.....	55
7.2.3.3.	DEGRADACJA GENOMOWEGO DNA.....	55
7.2.3.4.	ODWROTNA TRANSKRYPCJA NA MATRYCY RNA.....	55
7.2.3.5.	AMPLIFIKACJA SWOISTYCH FRAGMENTÓW cDNA (REAKCJA PCR).....	56
7.2.3.6.	ELEKTROFOREZA W ŻELU AGAROSOWYM.....	56
7.2.3.7.	AMPLIFIKACJA FRAGMENTÓW DNA Z DETEKcją W CZASIE RZECZYWISTYM (REAL-TIME PCR).....	56
7.2.4.	WESTERN BLOTTING.....	57
7.2.4.1.	LIZA KOMÓREK W BUFORZE RIPA.....	57
7.2.4.2.	LIZA KOMÓREK W BUFORACH DO IZOLACJI FRAKCJI JĄDROWEJ.....	57
7.2.4.3.	OZNACZENIE STĘŻENIA BIAŁKA METODĄ BCA.....	58
7.2.4.4.	ELEKTROFOREZA SDS-PAGE.....	58
7.2.4.5.	ELEKTROTRANSFER BIAŁEK.....	58
7.2.4.6.	DETEKCJA BIAŁEK IMMOBILIZOWANYCH NA BŁONIE NITROCELULOZOWEJ.....	59

7.2.5.	TEST ELISA.....	59
7.2.6.	ANALIZA STATYSTYCZNA.....	62
8.	WYNIKI.....	63
8.1.	WPŁYW STĘŻENIA IFN β NA INDUKCJĘ EKSPRESJI WYBRANYCH GENÓW.....	63
8.2.	WPŁYW LIGAZY UBIKWITYNY PELLINO3 NA EKSPRESJĘ WYBRANYCH GENÓW W ODPOWIEDZI NA IFN β	65
8.3.	WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA WYDZIELANIE WYBRANYCH CYTOKIN W ODPOWIEDZI NA IFN β	67
8.4.	ANALIZA EKSPRESJI GENÓW KODUJĄCYCH PODJEDNOSTKI RECEPTORA IFNAR W KOMÓRKACH Z NOKAUTEM GENU DLA PELLINO3.....	69
8.5.	WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA AKTYWACJĘ KINAZ BIAŁKOWYCH I CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH AKTYWOWANYCH PRZEZ IFN β	70
8.5.1.	WPŁYW PELLINO3 NA AKTYWACJĘ KINAZ BIAŁKOWYCH I CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH SZLAKU SYGNAŁOWEGO JAK-STAT.....	70
8.5.2.	WPŁYW PELLINO3 NA AKTYWACJĘ KINAZ BIAŁKOWYCH I CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH SZLAKU SYGNAŁOWEGO PROWADZĄCEGO DO AKTYWACJI NF κ B.....	72
8.5.3.	WPŁYW PELLINO3 NA AKTYWACJĘ KINAZ BIAŁKOWYCH MAPK.....	74
8.6.	WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA TRANSLOKACJE DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH, AKTYWOWANYCH W SZLAKACH SYGNAŁOWYCH POCHODZĄCYCH OD INTERFERONU TYPU I.....	75
8.6.1.	WPŁYW PELLINO3 NA TRANSLOKACJE DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH SZLAKU SYGNAŁOWEGO JAK-STAT.....	76
8.6.2.	WPŁYW PELLINO3 NA TRANSLOKACJE DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH SZLAKU SYGNAŁOWEGO NF κ B.....	78
8.7.	WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA EKSPRESJĘ WYBRANYCH GENÓW W ODPOWIEDZI NA INTERFERON β , W OBECNOŚCI INHIBITORA NF κ B – JSH23.....	80

8.8.	WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA EKSPRESJE WYBRANYCH GENÓW W ODPOWIEDZI NA INTERFERON β , W OBECNOŚCI INHIBITORA PROTEASOMU 26SMG-132.....	83
8.9.	WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA EKSPRESJE WYBRANYCH GENÓW W ODPOWIEDZI NA INTERFERON β , W OBECNOŚCI INHIBITORA PI3K – WORTMANNINY ORAZ W OBECNOŚCI INHIBITORA KINAZY BIAŁKOWEJ C – Ro318220.....	86
9.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	89
10.	DYSKUSJA.....	90
11.	WNIOSKI.....	101
12.	LITERATURA.....	102
13.	SPIS RYCIN I RYSUNKÓW.....	118
13.1.	RYCINY.....	118
13.2.	RYSUNKI.....	118

2. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AIDS	Zespół nabytego niedoboru odporności
α-IFNα	Interferon α, który wykazuje kwasolabilność
ATF	Aktywujący czynnik transkrypcyjny
BCA	Kwas bis-cynchoninowy
BMDM	Unieśmiertelnione mysie makrofagi pochodzenia szpikowego
BSA	Albumina wołowa
cAMP	Cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan
CD274	Ligand receptora programowanej śmierci 1
CDKN	Inhibitor kinaz zależnych od cyklin
cDNA	DNA uzyskany poprzez odwrotną transkrypcję na matrycy mRNA
c-Fos	Komórkowy protoonkogen, należący do genów wczesnej odpowiedzi komórkowej
<i>c-Myc</i>	Gen regulatorowy, który koduje czynniki transkrypcyjne
CO ₂	Dwutlenek węgla
CXCL9	Monokina indukowana przez interferon γ
CXCL10	Białko 10 indukowane interferonem γ
CXCL11	Indukowalny interferonem chemoatraktant limfocytów T
CREB	Białko wiążące element odpowiedzi na cAMP
cRel	Białko należące do rodziny białek NFκB
CrkL	Białko adaptorowe w szlaku sygnałowym
DC	Komórki dendrytyczne
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP	Mieszanina deoksynukleotydów
dsRNA	Dwuniciowy kwas rybonukleinowy
EAE	Eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu
EDTA	Kwas wersenowy
ELISA	Test immunoenzymatyczny (immunoenzymo-sorpcyjny)
Elk1	Czynnik transkrypcyjny Elk1
EMCV	Wirus zapalenia mózgu i mięśnia sercowego
ERK 1/2	Kinazy białkowe regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi
Ets1/2	Czynniki transkrypcyjne Ets1/2
FHA	Domena odpowiedzialna za interakcje między białkami

Fyn	Białko należące do rodziny kinaz Src
GAB2	Białko zaangażowane we wzmacnianie i integrację transdukcji sygnału
GAS	Elementy miejsca aktywacji interferonu gamma
GS3K	Kinaza syntazy glikogenu 3
H ₂ O	Woda
hCR	Ludzki receptor rozpoznający chemokiny
HLA-A	Grupa ludzkich antygenów leukocytarnych
HPRT	Fosforybozylotransferaza hipoksantynowo - guaninowa
HRP	Peroksydaza chrzanowa
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-alpha/beta receptor
IFNGR	Interferon-gamma receptor
IFNLR1	Receptor dla interferonu lambda 1
IFN β	Interferon β
IKK	Kinaza fosforylująca podjednostkę inhibitorową NF κ B
IL	Interleukina
IL10RB	Podjednostka receptora interleukiny 10 β
IRAK	Kinaza związana z receptorem dla IL1
IRF	Czynnik regulujący interferon
IRS-1	Substrat receptora insuliny 1
<i>ISG</i>	Geny stymulowane interferonem
ISGF	Czynnik genu stymulowany interferonem
ISRE	Element odpowiedzi stymulowany interferonem
I κ B α	Podjednostka inhibitorowa czynnika NF κ B
JAK	Kinazy janusowe
JNK	N-końcowa kinaza czynnika transkrypcyjnego c-Jun
JSH-23	Inhibitor translokacji jądrowej czynników Rel
<i>Jun</i>	Gen kodujący białko c-Jun, które w połączeniu z c-Fos tworzy czynnik transkrypcyjny AP-1
Kb	Kilo zasad 1 kb = 1000 par zasad
kDa	Kilodalton, jednostka masy atomowej
KO	Nokaut
LPS	Endotoksyna bakteryjna

MAF	Czynnik transkrypcyjny znany również jako protoonkogen
MAL	TIRAP adaptor IL-1
MALP2	Lipopeptyd 2 aktywujący makrofagi
MAPK	Kinazy aktywowane mitogenami
MAPKAP	Kinaza białkowa aktywowana kinazą MAP
MAPKK	Kinaza Białkowa fosforylująca kinazę MAP (inaczej MEK)
MEF2	Czynnik wzmacniający miocyty 2
MEK	Kinaza Białkowa fosforylująca kinazę MAP (inaczej MAPKK)
MEKK	Kinaza kinazy białkowej aktywująca MAPK
MG132	Inhibitor proteasomu - N-Benzyloksykarbonylo-L-leucylo-L-leucylo-L-leucyna
MHC	Główny układ zgodności tkankowej
MKK	Podwójnie specyficzna, aktywowana mitogenem kinaza kinazy białkowej
mRNA	Matrycowy kwas rybonukleinowy
MyD88	Białko adaptorowe receptorów TLR i IL-1R
NFAT	Czynnik transkrypcyjny aktywowanych komórek T
NFκB	Czynnik transkrypcyjny κB
NIK	Kinaza indukująca NFκB
NK	Populacja komórek układu odpornościowego posiadająca własności naturalnej cytotoxyczności
NOS-2	Syntaza tlenu azotu 2
NT	Komórki nietraktowane
OUN	Ośrodkowy układ nerwowy
oxLDL	Utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości
p38	Kinaza białkowa p38 aktywowana mitogenem
p53	Białko p53 – czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego
p65	Białko należące do rodziny Rel
Pam3CSK4	Trichlorowodorek Pam3Cys-Ser-(Lys)4 - selektywny agonista heterodimeru TLR1/TLR2
PBS	Buforowana fosforanem sól fizjologiczna
PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy
PDCD1	Białko programowanej śmierci komórkowej 1

<i>Peli3/PELI3</i>	Gen kodujący białko Pellino3
PI3K	Kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PKB, Akt	Kinaza białkowa B
PKC	Kinaza białkowa C
poly(I:C)	Kwas poliinozynowo-policytydylowy
PyK2	Białkowa kinaza tyrozynowa
R837	Imikwimod - agonista TLR7
RelB	Białko należące do rodziny białek Rel
RING	Domena katalityczna ligazy ubikwityny
RIP1	Białko oddziałujące z receptorem 1
RIPA	Bufor do oznaczania radioimmunoprecypitacji
RLR	Receptory RIG-I-podobne
RNA	Kwas rybonukleinowy
Ro318220	3-{3-[4-(1-Metylo-1H-indol-3-ilo)-2,5-dioekso-2,5-dihydro-1H-pirol-3-ilo]-1H-indol-1-il} karbami-midotioat propylu - inhibitor kinazy białkowej C
rRNA	Rybosomalny kwas rybonukleinowy
Rsk	Kinaza rybosomalna s6
RT PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
Sap-1	Sekretana proteza asparynowska 1
SDS	Dodecylosiarczan sodu
SDS-PAGE	Elektroforeza w warunkach denaturujących
SH2	Domena homologiczna dla Src2
SMAD	Białka aktywowane przez receptor
SP1	Białko specyficzności 1
SHP1	Fosfataza 1 zawierająca domenę regionu 2 homologii Src
Src	Protoonkogenna kinaza tyrozynowo-białkowa
STAT	Czynnik transkrypcyjny, transduktor sygnału i aktywator
TAE	Bufor octanowy z EDTA
TAK1	Kinaza 1 związana z TGFβ
TANK	Aktywator NFκB związany z rodziną TRAF
TBK1	Kinaza 1 wiążąca TANK
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TGFβ	Transformujący czynnik wzrostu β

THP-1	Linia ludzkich monocytów krwi obwodowej
TIR	Domena homologii receptora TLR/receptora dla IL-1
TLR	Receptor Toll-podobny
TRAF	Czynnik związany z receptorem TNF
TRIF	Białko adaptorowe posiadające domenę TIR, indukujące interferon β
TYK	Kinaza tyrozynowa
Vav	Czynnik wymiany nukleotydów guaninowych
VSV	Wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej
WNV	Wirus Zachodniego Nilu
WT	Typ dziki

3. STRESZCZENIE

Ochrona organizmu przed infekcją wirusową polega na indukowaniu i regulowaniu wrodzonych i nabytych mechanizmów odpornościowych. Jednym z takich mechanizmów jest pobudzenie komórek układu odpornościowego do produkcji cytokin przeciwwirusowych takich jak interferony (IFN), które zapewniają organizmowi wysoki stopień ochrony przed rozwojem chorób wirusowych. W regulację ekspresji genów dla IFN I zaangażowane są receptory rozpoznające wzorce (PRR), które wykrywają kwasy nukleinowe patogenów. Jednymi z takich receptorów są receptory transbłonowe Toll-podobne (TLR), których indukcja prowadzi do aktywacji ligazy ubikwityny Pellino3, która jest regulatorem szlaków sygnalizacyjnych indukowanych na skutek związania się liganda z receptorami TLR3 i TLR4, prowadzących do wydzielania IFN typu I. Biorąc pod uwagę fakt, że Pellino3 pośrednio wpływa na poziom produkowanego IFN β w szlakach TLR, w niniejszej pracy skupiono się na poznaniu roli białka Pellino3 w kaskadach sygnalizacyjnych aktywowanych przez interakcje IFN β z receptorem IFNAR.

Badania prowadzono na mysich makrofagach ze szpiku kostnego oraz na ludzkich monocytach z wykorzystaniem mysiego i ludzkiego rekombinowanego interferonu β . Uzyskane wyniki w pierwszym etapie badań pokazały, że ligaza ubikwityny Pellino3 jest zaangażowana w regulację procesu aktywacji ekspresji genów stymulowanych interferonem (ISG) oraz wydzielania cytokin, do których należą chemokiny Cxcl10, CXCL10 oraz Cxcl11.

W kolejnym etapie badań wykazano, że Pellino3 wpływa na fosforylację kluczowych białek szlaku sygnałowego JAK-STAT, takich jak kinaza TYK2 oraz czynnik transkrypcyjny STAT1. Ponadto ligaza Pellino3 bierze udział w translokacji do jądra komórkowego STAT1 oraz czynnika regulacyjnego IRF9.

W dalszych eksperymentach pokazano udział Pellino3 w kaskadzie sygnalizacyjnej transdukowanej IFN typu I aktywującej czynnik transkrypcyjny NF κ B. Wykazano, że obecność białka Pellino3 jest konieczna do fosforylacji i degradacji podjednostki inhibitorowej NF κ B - I κ B α , a także wymagana jest do translokacji do jądra komórkowego białek z rodziny NF κ B: p65, RelB i cRel.

Otrzymane wyniki z wykorzystaniem inhibitora NF κ B i inhibitora proteasomu 26S oraz dane literaturowe pozwoliły zaproponować dwa modele, w których Pellino3 jest zaangażowane w proces aktywacji NF κ B, w którym kluczową rolę odgrywają

białka TRAF. Pierwszy model sugeruje, że Pellino3 oddziałuje z TRAF6, prowadząc do aktywacji i degradacji I κ B α w proteasomie 26S, wpływając na translokację do jądra komórkowego białek p65/p50. Drugi model sugeruje, że Pellino3 oddziałuje z TRAF2, w konsekwencji ligaza ta wpływa na translokację białka RelB do jądra komórkowego.

4. ABSTRACT

The body protection against viral infection is inducing and regulating innate and acquired immune mechanisms. One of such a mechanism is stimulating immune cells to produce antiviral cytokines such as interferons (IFNs), which provide a high level of protection against the development of viral diseases. In the IFN I gene expression, regulation pattern recognition receptors (PRRs) are involved, that detect the nucleic acids of pathogens. One of such a receptor is the Toll-like receptors (TLRs) and their induction leads to the ubiquitin ligase Pellino3 activation, which regulates signaling pathways induced by ligand binding to TLR3 and TLR4 receptors, resulted in the secretion of type I IFN. Considering the fact, that Pellino3 indirectly influences the level of produced IFN β in TLR pathways, this work focused on understanding the role of Pellino3 in signaling cascades activated by IFN β interactions with IFNAR.

The studies were carried out on murine bone marrow derived macrophage and human monocytes using murine and human recombinant interferon β . The results obtained in the first stage of this study showed that the ubiquitin ligase Pellino3 is involved in the expression regulation of the interferon-stimulated genes (ISG), activation and the secretion of cytokines like Cxcl10, CXCL10 and Cxcl11.

In the next stage of the research, it was shown that Pellino3 influences the key proteins phosphorylation of the JAK-STAT signaling pathway, such as TYK2 kinase and STAT1 transcription factor. In addition, Pellino3 ligase is involved in the translocation into the nucleus of STAT1 and the regulatory factor IRF9.

In further experiments, the Pellino3 participation in the signaling cascade, transduced with type I IFN, that activates the transcription factor - NF κ B was shown. It has been shown that the Pellino3 protein presence is required for the phosphorylation and degradation of the NF κ B inhibitor subunit, I κ B α and is also required for translocation into the nucleus of the NF κ B family proteins: p65, RelB and cRel.

The obtained results with use of the NF κ B and the 26S proteasome inhibitors and literature data allowed to propose two models in which Pellino3 is involved in the NF κ B activation process, where TRAF proteins play a key role. The first model suggests that Pellino3 interacts with TRAF6, leading to the activation and degradation of I κ B α in the 26S proteasome, resulting in p65 / p50 proteins translocation into the nucleus. The second model suggests that Pellino3 interacts with TRAF2, consequently this ligase affects the RelB protein translocation to nucleus.

5. WSTĘP

Każdy organizm jest narażony na kontakt z różnorodnymi zakaźnymi czynnikami chorobotwórczymi, takimi jak wirusy, bakterie, grzyby czy pierwotniaki, dlatego w toku ewolucji zostały wytworzone mechanizmy rozpoznawania i usuwania patogenów. Począwszy od najprostszych organizmów jednokomórkowych, takich jak bakterie, po organizmy wielokomórkowe, takie jak kręgowce, które posiadają skomplikowany układ odpornościowy, organizmy te są w stanie rozpoznawać i eliminować obce drobnoustroje chorobotwórcze. Układ odpornościowy człowieka zawiera różnorakie rodzaje wyspecjalizowanych białek, komórek, tkanek i narządów, które wspólnie oddziałują ze sobą tworząc spójny i dynamiczny kompleks zwalczający patogeny. W eliminowaniu zakaźnych czynników chorobotwórczych wykorzystywany jest wrodzony układ odpornościowy zapewniający natychmiastową, lecz nieswoistą odpowiedź organizmu na patogeny. Jednakże, jeśli czynniki zakaźne unikną odpowiedzi wrodzonej, podbudzony zostanie adaptacyjny układ odpornościowy, który wytworzy odpowiedź odpornościową swoistą (nabytą). Układ odpornościowy rozpoznaje i aktywuje mechanizmy zwalczania czynników zakaźnych, prowadząc do pobudzenia produkcji cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych. Kluczowymi cytokinami pobudzonymi w wyniku infekcji drobnoustrojowych są interferony [Kopitar-Jerala, 2017]. W regulację ekspresji genów dla IFN I zaangażowane są receptory rozpoznające wzorce (PRRs), które wykrywają m.in. kwasy nukleinowe patogenów. W skład PRRs wchodzi receptory transbłonowe: receptory Toll-podobne (TLRs), receptory lektynowe typu C (CLRs) oraz receptory cytozolowe: receptory NOD-podobne (NLRs) i receptory RIG-I podobne (RLRs) [Thompson i wsp. 2011]. Indukcja odpowiedzi odpornościowej i produkcja cytokin prozapalnych podczas kaskad sygnałowych TLRs możliwa jest dzięki aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodzin NFκB, IRF oraz AP-1 i jest następstwem aktywacji kaskad fosforylacji oraz ubikwitynacji szeregu białek sygnałowych [Iwanaszko i Kimmel, 2015].

Ubikwitynacja jako proces potranslacyjnej modyfikacji białek, który kieruje je do degradacji, endocytozy, naprawy czy modyfikacji, pełni bardzo istotną funkcję w regulacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Proces ten polega na kowalencyjnym przyłączeniu reszty ubikwityny do białka docelowego. Substratem może być również inna cząsteczka ubikwityny. Na skutek poliubikwitynacji reszt lizynowych: K6, K11, K29, K33, K48 i K63 obecnych w strukturze ubikwityny powstaje

określony wzór łańcucha, który determinuje funkcję znakowanego białka. Łańcuch poliubikwitynowy z rozgałęzieniem K48 kieruje je do degradacji proteasomalnej, a łańcuch zawierający rozgałęzienie K63 związany jest z mechanizmami odpowiedzi komórkowej. W tym aspekcie ważną funkcję pełni ligaza ubikwityny E3, czynnik związany z białkami TRAF, która jest aktywowana przez ligazy IRAK i katalizuje poliubikwitynację K63 prowadzącą do regulacji ekspresji i wydzielania interferonów typu I [Huizen i Kikkert, 2020].

5.1. INTERFERONY

Interferon należy do rodziny helikalnych cytokin klasy 2 i jest glikoproteiną, która zawiera galaktozę [Dorner i wsp. 1973]. Został on odkryty w 1957 roku przez dwóch naukowców, Isaacs i Lindenmanna, którzy zaobserwowali produkcję nieznaną substancji przez kurze komórki embrionalne, traktowane wirusem grypy. Ta nieznaną substancję została określona jako interferon, ponieważ związek ten interferował z wirusem grypy oraz uniemożliwiał rozprzestrzenianie się infekcji na inne komórki [Isaacs i Lindenmann 1957]. Początkowa klasyfikacja wyróżniała trzy typy interferonów: IFN α , IFN β i IFN γ [Stewart i wsp. 1980]. Wydzielanie IFN α zaobserwowano w leukocytach, dlatego nazywano go IFN leukocytów, wydzielanie IFN β obserwowano w fibroblastach, w związku z tym określono go jako IFN fibroblastów [Havell i wsp. 1975], zaś wydzielanie IFN γ obserwowano głównie w limfocytach T, dlatego nazwano go IFN immunologicznym [Wheelock i wsp. 1965]. Przez wiele lat próba oczyszczenia wyizolowanego IFN z tkanek i komórek kończyła się niepowodzeniem, co ograniczało dostęp do poznania jego właściwości i funkcji. Dopiero po 20 latach od odkrycia IFN α , został on wyizolowany i oczyszczony w postaci homogennej, co umożliwiło jego pełną analizę [Rubinstein i wsp. 1979].

Obecnie wiadomo, że IFN są produkowane przez większość typów komórek, a ich klasyfikacja obejmuje trzy typy wyróżnione na podstawie homologii sekwencji nukleotydowej, interakcji z typem receptora, pozycją genów w ludzkim chromosomie, mapowaniem peptydów, a także ze względu na funkcje, jakie pełnią w układzie odpornościowym.

5.1.1. INTERFERONY TYPU I

Do interferonów typu I zaliczane są IFN α i IFN β , które są strukturalnie blisko powiązane ze sobą [Taniguchi i wsp. 1980], a także ω , κ , ϵ , ζ , τ , δ , ν , które mają zbliżoną budowę strukturalną i pełnią podobną funkcję. Białka te są wytwarzane przez wszystkie gatunki kręgowców. Wszystkie ludzkie geny IFN typu I wywodzą się z tego samego genu ancestralnego i za ich kodowanie odpowiedzialne jest wiele genów, położonych w krótkim ramieniu chromosomu 9, regionu 2, prążka 1 (9p21) [Trent i wsp. 1982]. Mysi IFN typu I jest kodowany przez geny znajdujące się w 4 chromosomie. Ssacze i ptasie IFN I nie zawierają intronów [Lawn i wsp. 1981]. Cytokiny te są regulatorami wzrostu i różnicowania się komórek [Clemens i wsp. 1985], wpływają na komunikację komórkową oraz na szlaki przekazywania sygnału, a także kontrolują odpowiedź odpornościową [Hertzog i wsp. 1994]. IFN typu I nie są inaktywowane w pH 2, w odróżnieniu od IFN γ , który jest nietrwały w środowisku kwaśnym [De Maeyer i De Maeyer-Guignard 1998].

Interferon α

W organizmie człowieka IFN α może być kodowany przez 13 strukturalnie różnych rodzajów genów *ifna*, zawierających geny niealleliczne, których sekwencje różnią się od siebie do 8%. IFN α składają się z 12 różnych białek o długości 165-166 aminokwasów. Pozostałe IFN typu I są kodowane przez jeden gen. IFN α zbudowane są z hydrofobowego sygnałowego peptydu, który zawiera 23 aminokwasy i z właściwego łańcucha aminokwasowego. Delecja w pozycji 44 spowodowała, że IFN α 2 zawiera 165 aminokwasów we właściwym łańcuchu aminokwasowym, zaś pozostałe IFN α posiadają 166 aminokwasów [Bekisz i wsp. 2004]. Podobieństwo pomiędzy sekwencjami aminokwasów poszczególnych rodzajów IFN α wynosi 78-99% [Harper i wsp. 2015]. IFN α bierze udział w obronie organizmu i jest wytwarzany w odpowiedzi na infekcję wywołaną różnymi mikroorganizmami.

W osoczu i surowicy osób z chorobami autoimmunologicznymi [DeStefano i wsp. 1982] takimi jak reumatoidalne zapalenie stawów czy zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS) [Lau i wsp. 1991] obserwuje się wysokie stężenie kwasolabilnego IFN α (al-IFN α) czyli nietypowego interferonu, który wykazuje kwasolabilność typową dla IFN γ . Jak dotąd nie wyjaśniono mechanizmu powstawania al-IFN α . Istnieje

hipoteza, że cytokina ta powstaje na skutek modyfikacji potranslacyjnych cząsteczki IFN α -al-IFN- α lub może być produktem odrębnego genu IFN. Wydzielanie tego białka może być efektem interakcji klasycznego IFN α z nieznanymi czynnikami obecnymi w osoczu i surowicy osób chorujących na AIDS i inne choroby autoimmunologiczne [Piasecki i wsp. 1999].

Interferon β

Większość organizmów koduje tylko jeden rodzaj IFN β . U niektórych ludzi obserwuje się więcej niż jedną kopię genu dla tej cytokiny [Ohlsson i wsp. 1985]. IFN β zawiera 166 aminokwasów i wykazuje 30% homologii aminokwasowej oraz 45% nukleotydowej z IFN α [Bekisz i wsp. 2004]. Białko to powstaje głównie w odpowiedzi na pojawienie się w komórce wirusowych kwasów nukleinowych [Luthra i wsp. 2011], podczas infekcji bakteryjnych [Boxx i wsp. 2016] oraz podczas różnicowania komórek mieloidalnych [Bickel i wsp. 1990]. W odpowiedzi na patogeny IFN β ulega ekspresji w wielu typach komórek, takich jak limfocyty B, limfocyty T, komórki NKT, makrofagi, fibroblasty, osteoblasty czy komórki śródbłonna, wywołując odpowiedź przeciwwirusową, przeciwzapalną, immunomodulacyjną oraz przeciwnowotworową [Abdolvahab i wsp. 2016]. IFN β znalazł zastosowanie jako substancja terapeutyczna i jest stosowany w leczeniu stwardnienia rozsianego [Filipi i Jack 2020] oraz zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C [Sasaki i wsp. 2015].

IFN β kontroluje odpowiedź przeciwzapalną, poprzez hamowanie migracji komórek zapalnych oraz redukcję aktywnych metabolitów reakcji zapalnej, takich jak TXA₂, PGI₂ i PGE₂, [Kuo i wsp. 2016]. U pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane, IFN β wpływa na reakcje zapalne, zmniejszając zdolność komórek prezentujących antygen do stymulowania limfocytów T. Dodatkowo IFN β zmniejsza adhezję limfocytów T do bariery krew-mózg, wpływając na przenikanie przez nią limfocytów T. IFN β indukuje regulatorowe limfocyty T (komórki T_{reg}) CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺, FOXP3⁺ i FoxA1⁺ [Dhib-Jalbut i Marks, 2010] oraz zapobiega różnicowaniu się komórek Th17, zmniejszając tym samym uwalnianie IL-17 [Guo i wsp. 2008].

Interferon ω

W 1985 roku trzy niezależne grupy badawcze odkryły nowy typ interferonu, obecnie nazywany IFN ω [Capon i wsp. 1985; Feinstein i wsp. 1985; Hauptmann i wsp. 1985]. Cytokina ta jest produkowana głównie w leukocytach [Yang i wsp. 2007]. Ze względu na dużą homologię sekwencji aminokwasowej z IFN α oraz wiązanie się do tego samego receptora, do którego wiążą się IFN α i IFN β , IFN ω został zaklasyfikowany do interferonów typu I. Sekwencja aminokwasowa tej cytokiny koduje białko o długości 172 aminokwasów i jest w 60% homologiczna z różnymi rodzajami IFN α oraz w 30% z IFN β [Flores i wsp. 1991]. IFN ω wykazuje działanie przeciwwirusowe, immunomodulujące, przeciwproliferacyjne i przeciwnowotworowe, dzięki czemu znalazł zastosowanie w leczeniu niektórych chorób i infekcji wirusowych ludzi i zwierząt [Li i wsp. 2017].

Interferon κ

IFN κ jest białkiem zawierającym 207 aminokwasów i wykazuje około 30% homologii z innymi członkami rodziny IFN typu I. Geny kodujące tę cytokinę jako jedyne spośród wszystkich genów kodujących IFN typu I posiadają pojedynczy intron w sekwencji 3'-UTR, bezpośrednio za kodonem stop. Infekcja wirusowa, ekspozycja na dwuniciowe RNA lub stymulacja IFN α i IFN β prowadzi do wzrostu ekspresji IFN κ w keratynocytach [LaFleur i wsp. 2001]. Ulega on również ekspresji w monocytach i komórkach dendrytycznych. IFN κ , podobnie jak IFN β , może wiązać się do heparyny [Nardelli i wsp. 2002].

Interferon ϵ

IFN ϵ składa się ze 187 aminokwasów. Analiza jego struktury białkowej pokazała, że białko to wykazuje homologię aminokwasową z innymi IFN typu I. Największe podobieństwo cytokina ta wykazuje do IFN β , z którym ma 38% identycznych reszt aminokwasowych. Obecnie u ludzi znaleziono tylko jednego przedstawiciela IFN ϵ , którego geny są zgrupowane na chromosomie 9p21, blisko loci innych białek z rodziny IFN typu I [Fu-Wang i wsp. 2007]. IFN ϵ ulega konstytutywnej ekspresji w płucach, mózgu, jelicie cienkim oraz tkankach rozrodczych, co wyróżnia

go na tle innych IFN typu I. Uważa się, że pełni on rolę ochronną w tkankach rozrodczych [Xi i wsp. 2012].

Interferon ζ

IFN ζ składa się ze 182 reszt aminokwasowych i wykazuje w 32% homologię z mysim IFN α i 26% podobieństwa do mysiego IFN β . Białko to ulega ekspresji w komórkach pochodzących ze śledziony, grasicy, płuc i gruczołu ślinowego. Podobnie jak IFN α i IFN β , IFN ζ wykazuje działanie przeciwnowotworowe, immunomodulujące i przeciwwirusowe. W przeciwieństwie do pozostałych białek z rodziny IFN typu I, a w szczególności IFN α , IFN ζ nie ma lub ma mniejsze właściwości mielosupresyjne, które są głównymi działaniami niepożądanymi terapii IFN α [Oritani i wsp. 2004].

Interferon τ

IFN τ jest białkiem zawierającym 172 aminokwasy i wykazującym w 75% homologię z IFN ω , zaś w 50% jest podobny do IFN α i w 25% do IFN β . W związku z wysoką homologią do innych IFN typu I, białko to ma dość podobną aktywność biologiczną. IFN τ nie jest indukowany w wyniku infekcji, podlega regulacji na poziomie ekspresji konstytutywnej i jest wydzielany przez płody owiec i bydła w celu zainicjowania tworzenia się łożyska. Jego podstawową funkcją jest zapewnienie ciągłości ciąży [Roberts i wsp. 2007]. U przeżuwaczy IFN τ jest główną cytokiną wytwarzaną przez trofektodermę okołomplantacyjną, która jest kluczowym czynnikiem w rozpoznawaniu ciąży przez matkę [Bai i wsp. 2012].

Interferon δ

IFN δ jest najmniejszą cytokiną spośród wszystkich wchodzących w skład rodziny IFN I, zbudowaną ze 149 aminokwasów. Białko to jest ściśle powiązane z IFN α , IFN ω oraz IFN τ , zaś z IFN β wykazuje niską homologię. Świński IFN δ jest produkowany w trofektodermie w okresie okołomplantacyjnym. Jego aktywność obserwuje się po 12 dniach w macicy ciężarnej świni, w 15-16 dniu ciąży stężenie IFN δ osiąga poziom maksymalny, a następnie zaczyna spadać. W przeciwieństwie do

ludzkiego IFN δ , w komórkach świń pełni on funkcję antywirusową oraz wykazuje aktywność antyproliferacyjną, która dodatkowo ulega zwiększeniu w obecności IFN γ [Lefèvre i wsp. 1998].

Interferon v

IFN ν jest najpóźniej i najslabiej poznanym IFN typu I. Jedynie u kotów ekspresji ulega funkcjonalne białko, lecz jego rola w organizmie jak dotąd nie została poznana. U pozostałych ssaków IFN ν występuje w postaci pseudogenu lub genu inaktywowanego [Krausea i Pestka 2005].

5.1.1.1. IFNAR

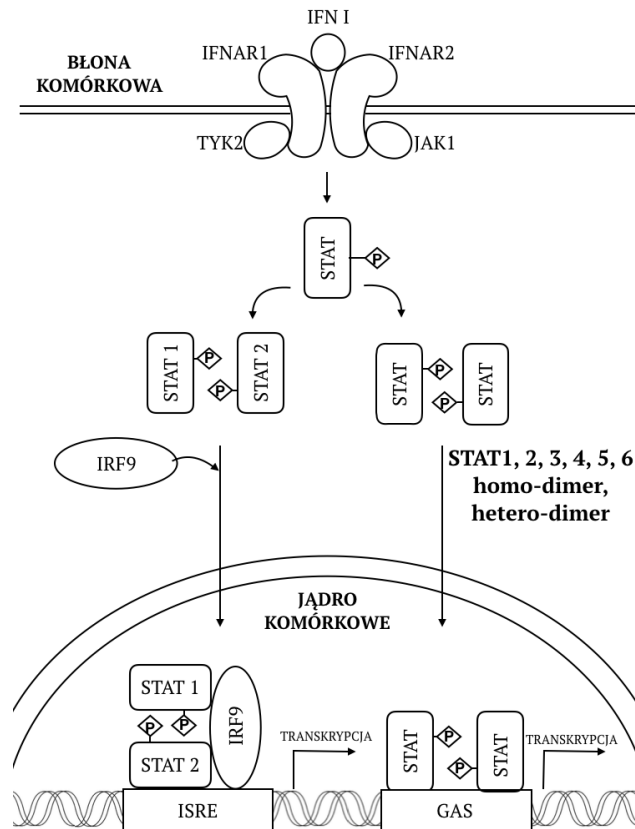
Wszystkie cytokiny wchodzące w skład IFN typu I są rozpoznawane i wiązane przez ten sam receptor INFAR. W skład INFAR wchodzi dwie podjednostki: IFNAR1 oraz IFNAR2, które należą do rodziny helikalnych receptorów cytokin klasy II (hCR). Białko IFNAR1 jest konstytutywnie związane z kinazą TYK2, a podjednostka IFNAR2 jest związana z kinazą JAK1. Związanie IFN typu I do receptora IFNAR umożliwia kinazom JAK1 i TYK2 utworzenie funkcjonalnej jednostki sygnalizacyjnej. Obie podjednostki białkowe IFNAR są silnie glikozylowane, dlatego w konsekwencji posiadają wysoką masę cząsteczkową. Ludzki IFNAR1 jest białkiem o masie cząsteczkowej około 130 kDa zbudowanym z 557 aminokwasów, zaś ludzki IFNAR2 ma masę 100-110 kDa i zawiera 515 aminokwasów [Zanin i wsp. 2021]. Geny kodujące ludzkie białka IFNAR1 oraz IFNAR2 zlokalizowane są na chromosomie 21. IFNAR1 posiada tylko jedną izoformę, podczas gdy IFNAR2 występuje w trzech izoformach: IFNAR2a, IFNAR2b, IFNAR2c. Funkcjonalny receptor tworzy jedynie izoforma IFNAR2c, powstająca w wyniku prawidłowej transkrypcji wszystkich siedmiu eksonów. Zewnątrzkomórkowa forma IFNAR2a powstaje w następstwie zaniku transkrypcji szóstego eksonu. Brak transkrypcji siódmego eksonu manifestuje się powstaniem izoformy IFNAR2b [De Weerd i wsp. 2007].

5.1.1.2. SZLAKI AKTYWOWANE INTERFERONAMI TYPU I

IFN typu I mogą aktywować różne kaskady sygnałowe: szlak sygnałowy JAK-STAT [Darnell i wsp. 1994], kaskadę sygnalizacyjną prowadzącą do aktywacji kinaz MAPK [Uddin i wsp. 1999] oraz szlak przekazywania sygnału prowadzący do aktywacji NFκB, w którym pośredniczy kinaza PI3K. We wszystkich szlakach sygnałowych aktywowanych IFN typu I kluczowym etapem wydaje się aktywacja kinaz JAK1 i TYK2 oraz fosforylacja czynników transkrypcyjnych STAT1 i STAT2. Fosforylacja napędza aktywację kanonicznej ścieżki sygnalizacyjnej, indukującej ekspresję geny stymulowane interferonem (ISG). Pierwszym etapem po związaniu liganda jest aktywacja kinazy TYK2 przez podjednostkę IFNAR1 [Gauzzi i wsp. 1996] oraz kinazy JAK1 przez podjednostkę IFNAR2.

SZLAK AKTYWUJĄCY JAK-STAT

Szlak aktywujący JAK-STAT jest kanoniczną i najlepiej poznaną kaskadą indukowaną przez IFN typu I. W szlaku tym, po związaniu cytokiny do receptora, następuje aktywacja kinazy JAK1 związanej z IFNAR2 oraz indukcja kinazy TYK2 związanej z IFNAR1 [Gauzzi i wsp. 1996], a następnie fosforylacja czynnika transkrypcyjnego STAT1 na tyrozynie 701 oraz fosforylacja czynnika transkrypcyjnego STAT2 na tyrozynie 690 [Yan i wsp. 1996; Steen i Gamero 2013]. Modyfikacje te prowadzą do formowania się homo- lub heterodimerów STAT [Shuai i wsp. 1994], które następnie wiążą się z czynnikiem regulującym IRF9 tworząc kompleks nazywany czynnikiem transkrypcyjnym ISGF3. Powstały kompleks jest transportowany do jądra komórkowego, w którym wiąże się z sekwencjami ISRE genomowego DNA inicjując transkrypcję genów ISG. Wykazano, że oprócz STAT1 i STAT2, także STAT3 [Yang i wsp. 1996], STAT4 [Nguyen i wsp. 2002], STAT5 [Meinke i wsp. 1996] oraz STAT6 [Gupta i wsp. 1999] mogą pośredniczyć w procesie aktywacji docelowych genów ISG. Ponadto, IFN typu I indukuje tworzenie homodimerów STAT1–STAT1, które wiążą elementy GAS obecne w promotorach niektórych ISG, inicjując w ten sposób transkrypcję tych genów.

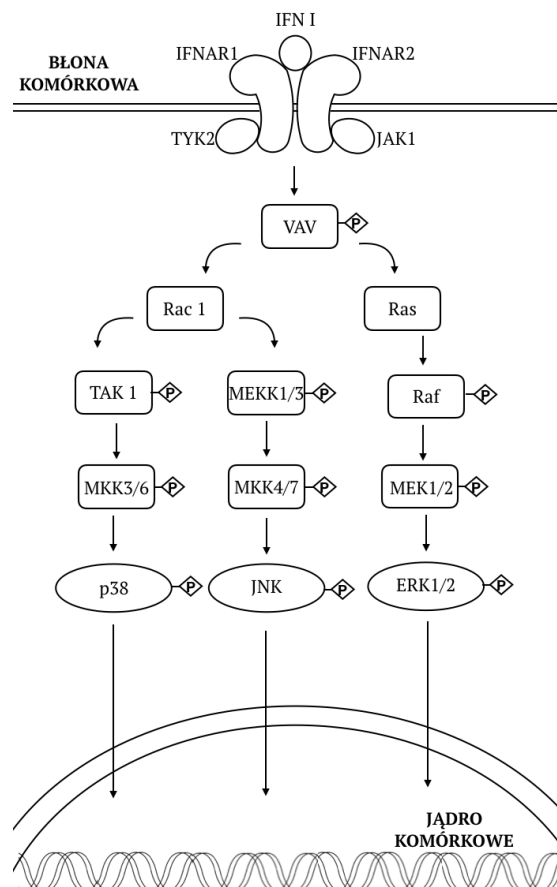


Ryc. 5.1. SZLAK AKTYWUJĄCY JAK-STAT: Po związaniu się IFN typu I z receptorem, IFNAR1 fosforyluje TYK2, a IFNAR2 fosforyluje JAK1. Następnie fosforylowany jest STAT, co skutkuje utworzeniem dimeru STAT-STAT. Utworzony kompleks jest translokowany do jądra komórkowego w obecności lub przy braku IRF9, indukując ekspresję ISG.

SZLAK AKTYWUJĄCY MAPK

IFN typu I może aktywować kinazy MAPK: kinazę p38, kinazę JNK i kinazę ERK. Po związaniu cytokiny z receptorem zachodzi aktywacja JAK1, a następnie fosforylacja białka Vav [Platanias i wsp. 1994] przez kinazę Tyk2 [Uddin i wsp. 1997]. Fosforylacja Vav prowadzi do aktywacji białek G, takich jak białko Ras i białko Rac1, które jest związane z białkiem Ras [Uddin i wsp. 2000]. Po aktywacji białka Ras, kinaza Raf (MAPKK) ulega fosforylacji, a w konsekwencji aktywacji ulegają kinazy MEK1 i MEK2. Fosforylacja kinaz MEK1 i MEK2 prowadzi do aktywacji kinaz ERK1 i ERK2. W alternatywnym szlaku sygnałowym, po aktywacji białka Rac1, fosforylacji ulegają TAK1 lub MEKK1 i MEKK3. Aktywacja TAK1 prowadzi do fosforylacji MKK3 lub MKK6, w wyniku czego aktywowana jest kinaza p38. Po fosforylacji MEKK1 lub MEKK3 indukowane są MKK4 i MKK7, a ich fosforylacja prowadzi do aktywacji kinazy JNK.

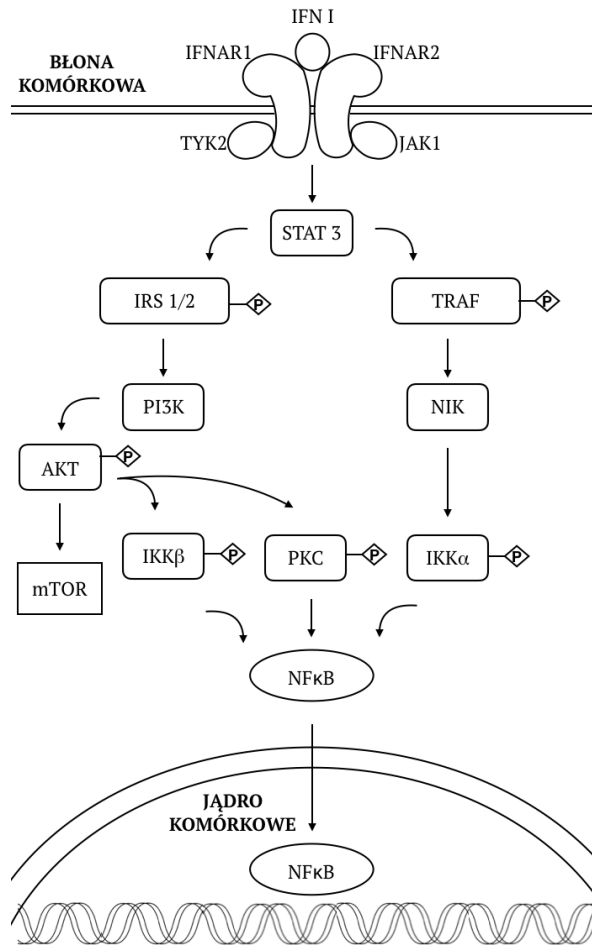
Fosforylowane kinazy MAPK aktywują różne zestawy czynników transkrypcyjnych. ERK1/2 reguluje aktywację c-Fos [Murphy i wsp. 2002], Ets1/2 [Yang i wsp. 1996], Elk1, Sap-1 [Gille i wsp. 1992], p53 [Milne i wsp. 1994], MEF2, STAT1/2, c-Myc, SP1 i SMAD. Kinaza p38 aktywuje Fos, ELK1, Sap-1, MEF2, MAPKAP i Rsk, natomiast kinaza JNK indukuje aktywację Jun, ELK1, NFAT i ATF2 [Hervas-Stubbs i wsp. 2011].



Ryc. 5.2. SZLAK AKTYWUJĄCY MAPK: Po związaniu się IFN typu I z receptorem, zachodzi aktywacja JAK1, która prowadzi do fosforylacji białka Vav przez kinazę Tyk2. Następnie aktywacji ulegają białko Ras lub białko Rac1. Aktywacja białka Ras skutkuje fosforylacją kinazy Raf, co z kolei aktywuje kinazy MEK1 i MEK2 i w konsekwencji prowadzi do aktywacji kinaz ERK1 i ERK2. Alternatywnie, zaktywowane białko Rac1 prowadzi do fosforylacji TAK1, następnie fosforylacji ulega MKK3 lub MKK6 i aktywowane jest białko p38. Dodatkowo, białko Rac1 może aktywować kinazy MEKK1 lub MEKK3, indukując i fosforylując MKK4 lub MKK7, a w konsekwencji aktywując kinazę JNK. Kinazy MAPK ulegają fosforylacji i translokacji do jądra komórkowego, gdzie aktywują różne zestawy czynników transkrypcyjnych.

SZLAK AKTYWUJĄCY NFκB

Stymulacja receptora dla IFN typu I może prowadzić do aktywacji NFκB na drodze dwóch szlaków sygnałowych: poprzez inicjację szlaku kinazy PI3K lub kaskady kinazy NIK. Oddziaływania cytokiny z receptorem prowadzą do aktywacji IFNAR i fosforylacji tyrozyny IFNAR1. Aktywowane są kolejno JAK1 i TYK2, co skutkuje fosforylacją tyrozyny białka adaptorowego IRS-1. Następnie IRS-1 wiąże się z białkiem z rodziny SH2, kinazą PI3K [Backer i wsp. 1992; Uddin i wsp. 1995]. W kaskadzie przekazywania sygnału aktywującej NFκB, czynnik transkrypcyjny STAT3 wiąże się z podjednostką receptora IFNAR1 i odgrywa rolę białka kotwiczącego kinazę PI3K do podjednostki IFNAR1 [Pfeffer i wsp. 1997]. Kinaza PI3K fosforyluje kinazę białkową B (PKB), znaną również Akt [Kaur i wsp. 2008]. Aktywowana kinaza Akt prowadzi do fosforylacji kinazy IKKβ, co skutkuje aktywacją czynnika transkrypcyjnego NFκB [Yang i wsp. 2000]. Ponadto aktywacja kinazy Akt stymuluje inny szlak, w którym aktywowane jest białko mTOR [Lekmine i wsp. 2003], limitujące ekspresję białek zaangażowanych w kontrolę podziału i proliferacji komórki, takich jak kinaza GSK-3 oraz inhibitory kinazy zależnej CDKN1A i CDKN1B. NFκB może być również aktywowany przez IFN typu I na drodze zależnej od kinazy NIK, za pośrednictwem fosforylacji czynników związanych z receptorem TRAF [Yang i wsp. 2005].



Ryc. 5.3. SZLAK AKTYWUJĄCY NFκB: Po związaniu się IFN typu I z receptorem, zachodzi aktywacja IFNAR, a STAT3 wiąże się z podjednostką IFNAR1 skutkując fosforylacją IRS-1. Następnie aktywowane jest PI3K, które fosforyluje Akt. Zdarzenie to prowadzi do fosforylacji IKKβ lub PKC, a w konsekwencji aktywowany jest NFκB. Alternatywnie, STAT3 może wiązać się z IFNAR1, powodując fosforylację TRAF. Następnie dochodzi do indukcji NIK, co skutkuje fosforylacją IKKα i prowadzi do aktywacji NFκB. W konsekwencji, zaktywowany NFκB jest translokowany do jądra komórkowego.

5.1.2. INTERFERON TYPU II

Jedynym członkiem należącym do podtypu interferonu II jest interferon γ , który na początku określany był jako interferon immunologiczny. IFN γ został odkryty w 1965 r. jako substancja antywirusowa wydzielana w odpowiedzi na stymulację ludzkich leukocytów fitohemaglutyniną [Wheelock i wsp. 1965]. Ze względu na swoją funkcję, początkowo IFN γ nazywano czynnikiem aktywacji makrofagów (MAF) [Nathan i wsp. 1983]. IFN γ nie jest strukturalnie powiązany z IFN typu I, ponieważ wiąże się z innym receptorem (IFNGR) i jest kodowany przez oddzielne locus chromosomalne.

Pierwotnie twierdzono, że IFN γ może być wydzielany przez limfocyty Th1, limfocyty cytotoksyczne CD8 $^{+}$ oraz komórki NK [Bach i wsp. 1997; Young i wsp. 1996], lecz obecnie wiadomo, że IFN γ wytwarzany jest również przez inne komórki, takie jak limfocyty B, komórki NKT, monocyty, makrofagi i komórki dendrytyczne (DC) [Schroder i wsp. 2004]. IFN γ wykazuje właściwości przeciwwirusowe, immunoregulacyjne i przeciwnowotworowe. W monocytach, makrofagach i komórkach dendrytycznych pełni on rolę w parakrynej aktywacji sąsiednich komórek i jest wydzielany przez te komórki we wczesnej fazie infekcji, a w przypadku limfocytów T wytwarzany jest w fazie później, modulując swoistą odpowiedź odpornościową [Gessani i wsp. 1998; Frucht i wsp. 2001]. Czynniki regulującymi wydzielanie IFN γ przez komórki układu odpornościowego są IL-12 i IL-18 [Golab i wsp. 1998], zaś inhibitorami wydzielania IFN γ są transformujący czynnik wzrostu- β , glikokortykoidy, IL-4 i IL-10 [Fukao i wsp. 2000; Schindler i wsp. 2001]. Ludzki IFN γ jest homodimerem o masie cząsteczkowej 17kDa, zbudowanym z dwóch polipeptydów samo-asocjujących w sposób antyrównoległy, skutkujący utworzeniem cząsteczki o podwójnej osi symetrii i wpływającej na wiązanie się IFN γ do jego receptora [Bach i wsp. 1997].

5.1.2.1. IFNGR

Receptor rozpoznający IFN γ zbudowany jest z dwóch łańcuchów IFNGR1, dwóch podjednostek IFNGR2 oraz białek adaptorowych. Rolą łańcuchów IFNGR1 jest wiązanie liganda do receptora, a podjednostek IFNGR2 przekazywanie sygnału do wnętrza komórki. Podjednostki receptora IFNGR1 i IFNGR2 należą do rodziny receptorów cytokin klasy II. Pojedynczy homodimer IFN γ może wiązać dwie cząsteczki receptora IFN γ , ponieważ cząsteczka IFN γ posiada podwójną oś symetrii [Bach i wsp. 1997]. Ludzki IFNGR1 jest kodowany przez 30 kb gen, który jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 6 [Pfizenmaier i wsp. 1988], zaś u myszy IFNGR1 koduje 22 kb gen, obecny na chromosomie 10 [Mariano i wsp. 1987]. Podjednostka IFNGR1 występuje na powierzchni prawie wszystkich komórek eukariotycznych. Ekspresja łańcucha IFNGR2 jest regulowana przez bodźce zewnętrzne, dlatego regulacja genu IFNGR2 jest krytycznym czynnikiem odpowiedzi na IFN γ . Zarówno ludzki jak i myszy gen IFNGR1 składa się z 7 eksonów. Domena zewnątrzkomórkowa jest kodowana przez eksony od 1 do 5. Część bliższego regionu błonowego domeny zewnątrzkomórkowej i domeny transbłonowej koduje egzon 6, zaś domenę

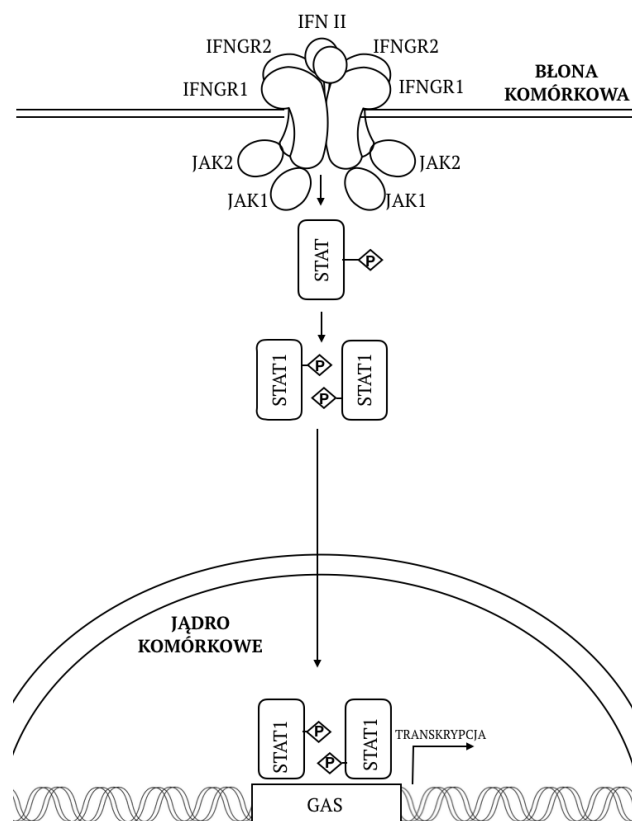
wewnątrzkomórkową egzon 7 [Bach i wsp. 1997]. Ludzki gen łańcucha IFNGR2 znajduje się na chromosomie 21q22.1 [Soh i wsp. 1994]. Mysi gen IFNGR2 jest zlokalizowany na chromosome 16 [Hibino i wsp. 1991] i składa się 7 eksonów, a w obrębie regionu flankującego 5' zawiera potencjalne miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych [Bach i wsp. 1997].

5.1.2.2. SZLAKI AKTYWOWANE INTERFERONEM TYPU II

IFN γ aktywuje produkcję cytokin w kanonicznym i niekanonicznym szlaku przekazywania sygnału. IFN γ tworzący dimer, wiążąc się do IFNGR, związanego z kinazą JAK1 i JAK2. Po aktywacji IFNGR przez IFN γ , powstały kompleks receptor-ligand ulega internalizacji i dysocjacji, a następnie IFN γ jest uwolniony z kompleksu i transportowany do lizosomu, gdzie ulega degradacji [Bach i wsp. 1997].

KANONICZNY SZLAK AKTYWOWANY IFN γ

W kanonicznej ścieżce sygnalizacyjnej, IFN γ w postaci dimeru wiąże się z dwiema podjednostkami IFNGR1, powodując zmiany konformacyjne receptora w wyniku czego dochodzi do oddziaływań JAK1 z łańcuchem IFNGR1 oraz JAK2 z podjednostką IFNGR2. W konsekwencji dochodzi do fosforylacji STAT przez kinazy JAK1 i JAK2 i powstania homodimeru STAT1 [Green i wsp. 2017] oraz jego translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z sekwencjami GAS genomowego DNA, genów regulowanych przez IFN γ , takich jak HLA-A, NOS-2, IRF1, PDCD1 i CD274 [Decker i wsp. 1997].

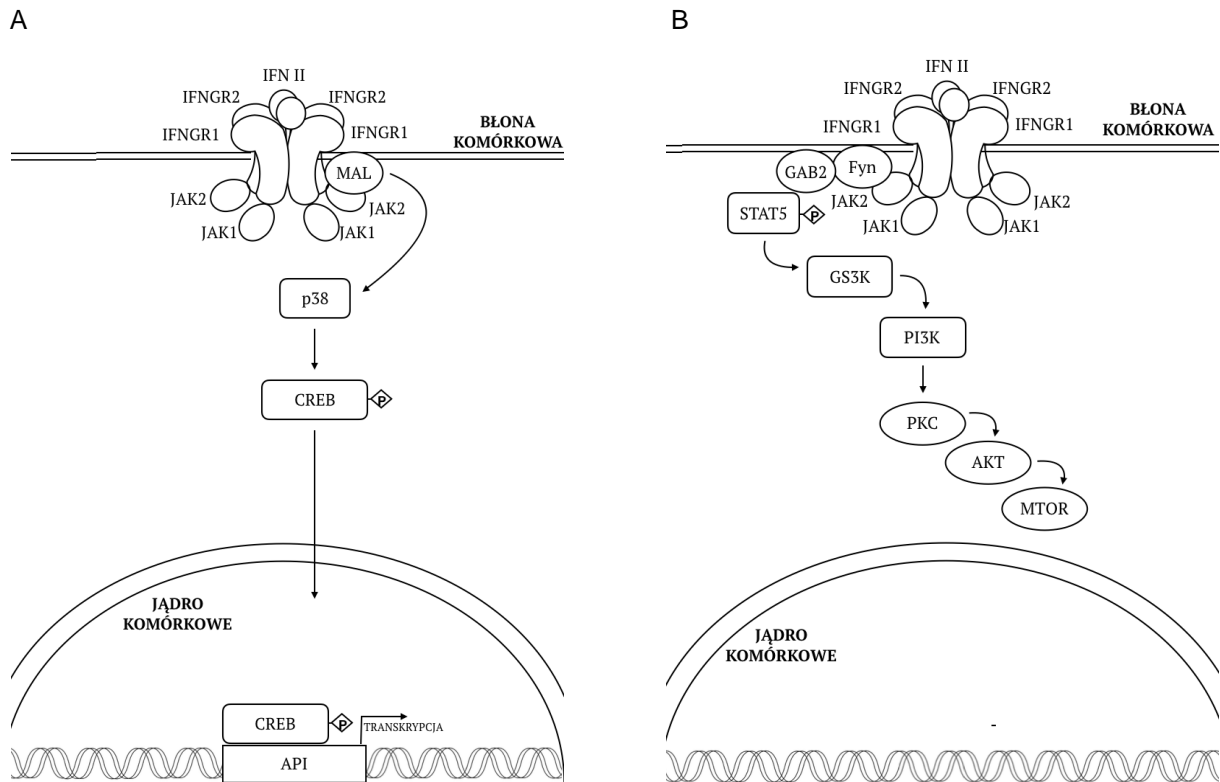


Ryc. 5.4. KANONICZNY SZLAK AKTYWOWANY IFN γ : IFN γ w postaci dimeru, wiąże się z dwiema podjednostkami IFNGR1. Następuje fosforylacja kinaz JAK1 i JAK2 oraz fosforylacja homodimeru STAT1. Utworzony kompleks STAT1-STAT1 jest translokowany do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z GAS, a w konsekwencji dochodzi do transkrypcji ISG.

NIEKANONICZNY SZLAK AKTYWOWANY IFN γ

Niekanoniczny szlak sygnalizacyjny może być aktywowany przez IFN γ niezależnie od obecności czynnika transkrypcyjnego STAT1. W takim przypadku zostaje aktywowany STAT3 w procesie zależnym od kaskady JAK-STAT, a w konsekwencji następuje aktywacja genów regulowanych przez GAS [Qing i Stark 2004]. W alternatywnym szlaku przekazywania sygnału aktywowanym przez IFN γ , aktywacja IFNGR skutkuje rekrutacją białek adaptorowych MAL [Cheallaigh i wsp. 2016] i Fyn [Uddin i wsp. 1997], związanych z podjednostką IFNGR2. Aktywacja białka adaptorowego MAL indukuje szlak sygnałowy poprzez fosforylację kinazy p38, a następnie fosforylację i aktywację czynnika transkrypcyjnego CREB, który ulega translokacji do jądra komórkowego [Green i wsp. 2017]. W konsekwencji prowadzi to do zwiększenia ekspresji chemokiny CXCL10, białek skierowanych przeciwko Mycoplazmie i tworzenia autofagosomów [Cheallaigh i wsp. 2016]. W szlaku

aktywującym białko adaptorowe Fyn dochodzi do utworzenia związanego z receptorem kompleksu Fyn-GAB2-pSTAT5, co powoduje aktywację kinaz GS3K, a następnie PI3K. Transdukcja PI3K prowadzi do aktywacji kinazy PKC, a w konsekwencji do regulacji odpowiedzi zależnej od AKT/mTOR [Uddin i wsp. 1997].



Ryc. 5.5. NIEKANONICZNY SZLAK AKTYWOWANY IFN γ : (A) Zaktywowany IFNGR prowadzi do rekrutacji MAL, co w konsekwencji indukuje szlak sygnałowy prowadzący do fosforylacji p38, a następnie aktywacji CREB, który jest translokowany do jądra komórkowego. (B) Aktywacja IFNGR może również prowadzić do rekrutacji Fyn, w wyniku czego powstaje kompleks Fyn-GAB2-pSTAT5, co skutkuje aktywacją GS3K. W konsekwencji indukowana jest kinaza PI3K, która następnie aktywuje kinazę PKC, co w rezultacie prowadzi do regulacji odpowiedzi zależnej od AKT/mTOR.

5.1.3. INTERFERONY TYPU III

Do rodziny interferonów typu III zaliczane są trzy cytokiny, spokrewnione z białkami z rodziny IFN typu I oraz rodziną interleukin 10, które pierwotnie zostały nazwane jako interleukina 28A, interleukina 28B i interleukina 29 [Sheppard i wsp. 2003]. Według obecnej nomenklatury, przedstawicielami IFN typu III są IFN λ 1, IFN λ 2 i IFN λ 3. Ponadto u ludzi występuje także pseudogen IFN λ 4. [Fox i wsp. 2009]. Geny *IFNA1*, *IFNA2* oraz *IFNA3* zlokalizowane są na chromosomie 19, w miejscu 19q13.

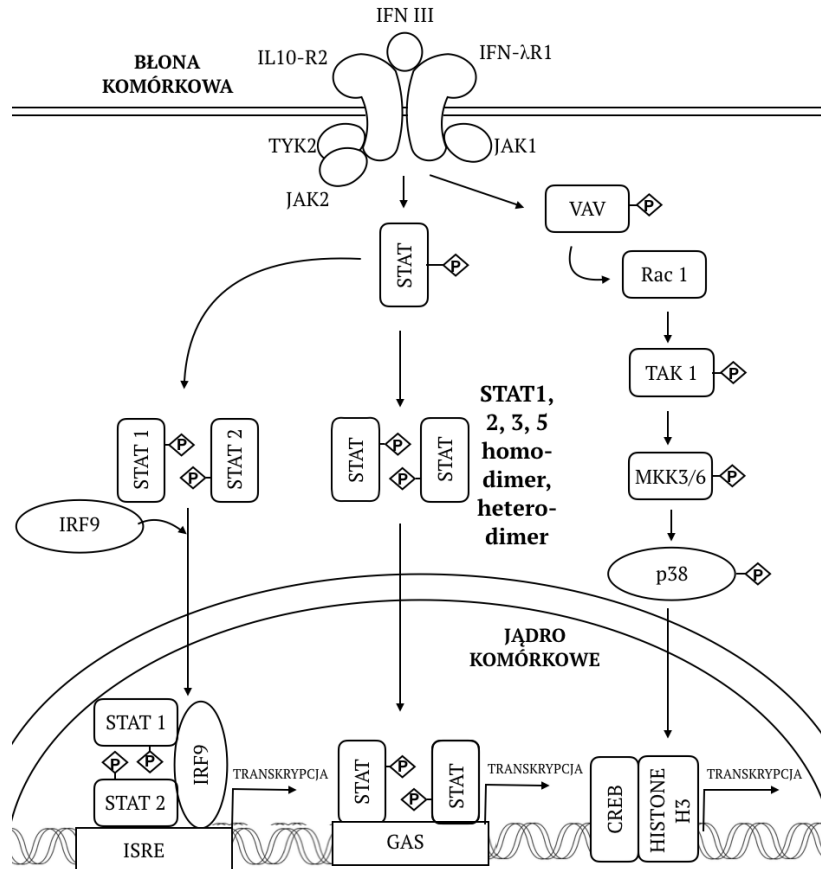
Geny *ifnλ2* i *ifnλ3* mogą zawierać dodatkowy ekson 1a, więc w wyniku ekspresji tych genów powstaje białko dłuższe o 4 aminokwasy, umiejscowione na *N*-końcu cytokin IFNλ2 i IFNλ3 [Kotenko i wsp. 2003]. Pod względem budowy IFNλ wykazuje duże podobieństwo do białek z rodziny IL-10, lecz geny *IFNλ* wykazują nie więcej niż 20% homologii w sekwencji aminokwasowej do IL-10. Podobny stopień homologii wykazują również z IFN typu I co sugeruje, że *IFNλ* są ewolucyjnie powiązane z rodziną IL-10 oraz IFN typu I [Sheppard i wsp. 2003]. IFNλ wykazuje aktywność przeciwwirusową skutkującą zmniejszeniem się cytopatogenności komórek zakażonych wirusami takimi jak VSV lub EMCV. Ponadto cytokiny te mają działanie immunomodulacyjne, co potwierdza zdolność IFNλ do indukowania antygenów MHC klasy I [Kotenko i wsp. 2003].

5.1.3.1. IFN-λR1 - IL-10R2

Receptor rozpoznający IFNλ zbudowany jest z dwóch podjednostek: podjednostki wiążącej ligand, IFN-λR1 (nazywanej również CRF2-12 lub IL-28Ra) oraz z podjednostki pomocniczej, IL-10R2 (nazywanej również CRF2-4 lub IL-10Rβ) [Kotenko i wsp. 2003]. Tylko taka konfiguracja podjednostek daje funkcjonalny receptor rozpoznający i wiążący IFNλ oraz aktywujący wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe. Gen kodujący podjednostkę R1 receptora rozpoznającego IFNλ, *IFN-λR1* zlokalizowany jest na chromosomie 1 w miejscu 1p35. Gen kodujący łańcuch R2, *IL-10Rβ* znajduje się na chromosomie 21. Podjednostka IL-10R2 ulega ekspresji we wszystkich tkankach, zaś białko receptorowe IFN-λR1 jest obecne tylko w niektórych typach komórek. W konsekwencji występowanie kompletnego kompleksu receptora rozpoznającego IFNλ jest zawężone do tych typów komórek, które mają zdolność ekspresjonowania podjednostki IFN-λR1, np. komórek nabłonkowych [Sommereyns i wsp. 2008].

5.1.3.2. SZLAK AKTYWOWANY INTERFERONAMI TYPU III

Dokładny mechanizm działania IFN typu III nie został jeszcze poznany. Jednakże wiadomo, że IFN typu III aktywują te same szlaki sygnalizacyjne co IFN typu I. Podjednostka wiążąca ligand, IFN-λR1, zawiera długą wewnątrzkomórkową domenę, która związana jest z kinazą Jak1. Natomiast łańcuch pomocniczy receptora, IL-10R2, związany jest z kinazą Jak2 oraz Tyk2 [Kotenko i wsp. 2003]. Po związaniu się IFN typu III do receptora powstaje kompleks, który umożliwia aktywację kinaz Jak1 i Tyk2. W konsekwencji dochodzi do fosforylacji czynników transkrypcyjnych STAT1 i STAT2. Ufosforylowane białka STAT1 i STAT2 tworzą dimer, do którego dołączany jest czynnik regulatorowy IRF9. Utworzony kompleks ISGF3 jest translokowany do jądra komórkowego, co z kolei aktywuje ekspresję ISG. Fosforylacja Jak2 może również aktywować inne czynniki transkrypcyjne STAT (STAT3 i STAT5), co prowadzi do powstania homodimeru STAT1, który po translokacji do jądra komórkowego wiąże się do DNA w swoistych sekwencjach GAS. IFN typu III, podobnie jak IFN typu I, indukują również szlaki sygnałowe aktywujące kinazy MAPK [Vilcek 2003].



Ryc. 5.6. SZLAK AKTYWOWANY IFNλ: Związanie się IFN III do receptora powoduje aktywację Jak1 i Tyk2. Następnie STAT1 i STAT2 ulegają fosforylacji i w konsekwencji powstaje dimer STAT1-STAT2, do którego dołączany jest IRF9. W rezultacie powstaje kompleks STAT1-STAT2-IRF9, który jest translokowany do jądra komórkowego, co skutkuje ekspresją ISG. Jeśli fosforylacji ulega Jak2, mogą zostać aktywowane inne STAT. W konsekwencji zostaje utworzony homodimer STAT1, który migruje do jądra komórkowego, gdzie wiąże się do GAS. Dodatkowo IFN III aktywują kaskady przekazywania sygnału, podczas których dochodzi do transdukcji kinaz MAPK.

5.2. PELLINO

Indukcja odpowiedzi odpornościowej i aktywacja prozapalnych cytokin podczas kaskady sygnalizacyjnej TLR odbywa się poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych z rodziny NFκB. Stymulacja receptorów TLR skutkuje aktywacją kinaz IKK, a w konsekwencji prowadzi do translokacji NFκB do jądra komórkowego [Conze i wsp. 2008]. W szlakach sygnałowych indukowanych przez aktywację receptorów TLR3 i TLR4 do wydzielania IFN I dochodzi w wyniku aktywacji kinaz IKKε i TBK1, które fosforylują czynniki regulatorowe IRF3 oraz IRF2 [Clark i wsp. 2011]. Czynniki determinujące przekazywanie sygnału od TLR stanowią białka adaptorowe tych receptorów, takie jak TRIF oraz MyD88. TRIF jest mediatorem szlaku sygnałowego TLR3 i TLR4. IL1R oraz prawie wszystkie kaskady TLR (wyjątek TLR3) zależą od białka MyD88, które prowadzi do aktywacji IRAK1, IRAK2, IRAK4, TRAF6 oraz ligazy ubikwityny [Hu i wsp. 2015]. Po związaniu się MyD88 do receptora IL1R lub TLR, następuje rekrutacja białek IRAK4 i IRAK1. W konsekwencji dochodzi do fosforylacji IRAK1, co powoduje rekrutację TRAF6. W rezultacie dochodzi do autoubikwitynacji TRAF6 z łańcuchami poliubikwityny połączonymi z K63. Ubikwitynowany TRAF6 aktywuje kinazę TAK1, powodując fosforylację IκBα przez kinazy IKK. Następnie białko inhibitorowe IκBα ulega proteosomalnej degradacji przez proteasom 26S. W konsekwencji dochodzi do uwolnienia dimeru NFκB, który jest translokowany do jądra komórkowego. Ubikwitynacja ma kluczowe znaczenie w przekazywaniu sygnałów w kaskadach sygnałowych indukowanych przez receptory TLR prowadzących do aktywacji NFκB [Conze i wsp. 2008].

Pellino to rodzina ligaz ubikwityny E3 [Bulter i wsp. 2007], regulująca szlaki sygnałowe receptorów IL-1 i TLR [Moynagh 2014]. Odkryto ją u *Drosophila melanogaster* podczas obserwacji interakcji tego białka z domeną kinazową Pelle, homologiczną do kinazy związanej z receptorem IRAK u ssaków [Großhans i wsp. 1999]. Końce karboksylowe białek Pellino zawierają konserwatywne powtórzenia reszt cysteiny i histydyny, podobne do domeny RING-podobnej [Rich i wsp. 2000]. N-końiec białek z rodziny Pellino posiada domenę FHA pozwalającą na interakcję z substratem fosforylowanym przez białko IRAK1. Ponadto w białkach z rodziny Pellino w domenie FHA obserwuje się nietypowe dwie długie sekwencje insercji przypominające skrzydło, których nie zaobserwowano w innych domenach FHA [Lin i wsp. 2008]. Rodzina ssaczych ligaz Pellino obejmuje trzy białka: Pellino1 [Jiang i wsp.

2003], Pellino2 [Yu i wsp. 2002] oraz Pellino3 [Jensen i wsp. 2003]. Wszyscy członkowie tej rodziny odgrywają rolę w regulacji szlaków sygnałowych receptorów TLR i receptora IL-1R [Jiang i wsp. 2003; Yu i wsp. 2002; Jensen i wsp. 2003]. Funkcją tych ligaz jest kontrola aktywacji NFκB i kinaz MAPK [Jensen i wsp. 2003; Butler i wsp. 2005; Jiang i wsp. 2003]. Białka Pellino mogą pełnić zarówno rolę białek adaptorowych, jak również indukować poliubikwitynację IRAK1 [Schauvliege i wsp. 2006]. Po fosforylacji IRAK1 lub IRAK4 zwiększa się aktywność Pellino jako ligazy E3, która pośredniczy w indukowanym przez IL-1 tworzeniu kompleksu łańcuchów poliubikwitynowych-IRAK1 połączonych lizyną-63 (K63), powodując aktywację IKKβ i czynnika transkrypcyjnego NFκB [Ordureau i wsp. 2008].

5.2.1. PELLINO1

Pierwsze badania prowadzone z udziałem białka Pellino1 wykazały, że ligaza ta reguluje aktywację NFκB zależną od receptora IL-1R [Jiang i wsp. 2003] indukowaną przez cytokinę TGFβ. Interakcje Pellino1 z białkami SMAD6 i SMAD7 powodują destabilizację kompleksu MyD88-IRAK1-IRAK4-TRAF6. W konsekwencji aktywacja NFκB i ekspresja zależnych od niego genów prozapalnych są zahamowane na skutek zaburzonej interakcji Pellino1 z białkami IRAK1, IRAK4 i TRAF6 [Choi i wsp. 2006; Lee i wsp. 2010].

Dalsze badania wykazały, że Pellino1 pełni rolę w regulacji szlaków sygnałowych TLR takich jak TLR3 i TLR4 [Chang i wsp. 2009]. Ze względu na interakcje z RIP1, kinazą adaptacyjną indukującą białko TRIF, które zawiera domenę TIR, białko to ma kluczowe znaczenie w stymulowanej przez TLR3 i TLR4 aktywacji IKK i NFκB. Stymulowany przez TRIF kompleks TBK1–IKKε fosforyluje i aktywuje Pellino1, prowadząc do ubikwitynacji RIP1 i zależnej od TRIF aktywacji NFκB [Goh i wsp. 2012; Smith i wsp. 2011]. Zaobserwowano również, że myszy z niedoborem Pellino1 są odporne na wstrząs septyczny, który występuje u myszy typu dzikiego po podaniu ligandów Poly(I:C) i LPS. Badając mechanizm tej oporności wykazano, że Pellino1 jest pozytywnym regulatorem cytokin prozapalnych, TNF i IL-6, w odpowiedzi na stymulację receptorów TLR3 i TLR4 odpowiednio ligandami Poly(I:C) i LPS [Chang i wsp. 2009].

Pellino1 ulega silniej ekspresji w komórkach mikrogleju, które pełnią kluczową rolę w patogenezie stwardnienia rozsianego. Wykazano, że ligaza ta promuje

aktywację komórek mikrogleju podczas indukcji eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE), pośredniczy w aktywacji cytokin prozapalnych i chemokin, a w konsekwencji powoduje migrację limfocytów T do OUN. Myszy z niedoborem białka Pellino1 wykazywały łagodniejszy przebiegu EAE [Xiao i wsp. 2013].

Wykazano, że niedobór białka Pellino1 u myszy powoduje zmniejszone miano wirusa WNV w tkankach, co skutkuje łagodniejszym przebiegiem infekcji oraz zapobiega śmierci komórek wywołanych infekcją WNV. W zakażeniu WNV Pellino1 pełni funkcję pozytywnego regulatora zapalenia OUN. Pośredniczy w zwiększeniu produkcji chemokin i cytokin prozapalnych w komórkach mikrogleju oraz indukuje migrację limfocytów T i makrofagów do OUN. Ponadto, obecność tej ligazy jest wymagana przy wnikaniu i replikacji wirusa w komórkach OUN.

W zakażeniu wywołanym przez wirus VSV Pellino1 jest negatywnym regulatorem wydzielania IFN β w szlakach sygnałowych TLR w komórkach mikrogleju. Pellino1 uczestniczy w hamowaniu kaskady sygnalizacyjnej pośredniczącej w aktywacji TBK1 i IKK ϵ . W komórkach mikrogleju z niedoborem Pellino1 wykazano zwiększoną ochronę przed zakażeniem wirusem VSV [Xiao i wsp. 2015].

5.2.2. PELLINO2

Pellino2 jest najłabiej poznanym białkiem z rodziny ligaz Pellino. Bierze udział w kaskadach sygnałowych zależnych od receptorów TLR i IL-1R, prowadzących do aktywacji NF κ B. Pellino2 pełni funkcję białka rusztowania regulując ścieżki sygnałowe prowadzące do aktywacji kinaz MAPK, ERK i JNK [Jensen i wsp. 2003], a wyciszenie genu kodującego białko Pellino2 powoduje zmniejszenie aktywacji kinaz MAPK indukowanych IL-1 oraz LPS [Kim i wsp. 2012]. Dodatkowo ligaza Pellino2 może oddziaływać z białkami IRAK1, TRAF6 oraz TAK1 [Strelow i wsp. 2003].

5.2.3. PELLINO3

Ostatnie białko rodziny – Pellino3 występuje w dwóch formach: dłuższej, Pellino3L (Pellino3a) i krótszej, Pellino3S (Pellino3b). Obie formy Pellino3 odgrywają istotną rolę w aktywacji kinaz MAP poprzez aktywację czynników c-Jun i Elk-1. Podobnie jak inni członkowie rodziny Pellino, Pellino3 oddziałuje z IRAK1, a także z

partnerami kompleksu sygnałowego - TRAF6, TAK1 i NIK [Jensen i wsp. 2003]. Innym szlakiem, który aktywuje Pellino3 jest kaskada kinazy p38, w której pośredniczy aktywacja IL-1R. W rezultacie Pellino3 indukuje czynnik transkrypcyjny CREB [Butler i wsp. 2005]. Ponadto Pellino3 hamuje sygnalizację IL-1 w wyniku regulacji degradacji IRAK poprzez aktywność ligazy ubikwitynowej E3. Pellino3 obniża zależne od TAK1 etapy sygnalizacji aktywacji NFκB, takie jak fosforylacja TAK1/TAB1 i IKKα/β oraz degradacja IκBα [Xiao i wsp. 2008].

Dodatkowo Pellino3 jest negatywnym regulatorem ekspresji IFN I w kaskadzie sygnalizacyjnej TLR3 zależnej od TRIF. Aktywacja Pellino3 prowadzi do ubikwitynacji TRAF6 na skutek interakcji TRAF6 z ligazą, powodując tłumienie oddziaływań TRAF6-IRF7. W rezultacie dochodzi do zmniejszenia indukcji IRF7, a w konsekwencji do zmniejszenia ekspresji IFN typu I [Siednienko i wsp. 2012]. Ponadto Pellino3 pośredniczy w hamowaniu zależnego od białka TRIF szlaku sygnalizacyjnego TLR4, powodując obniżenie ekspresji IFN typu I w makrofagach na drodze oxLDL zależnej. [Tzieply i wsp. 2012].

W procesie infekcji VSV zależnej od receptora RLR, Pellino3 jest regulatorem ekspresji IFN I i cytokin prozapalnych poprzez modulację przekazywania sygnału ERK1/2. W zainfekowanych wirusem VSV komórkach BMDM z wyciszonym genem dla białka Pellino3 zachodzi wydajniejsza replikacja cząsteczek wirusa, w porównaniu do komórek typu dzikiego. Skutkiem zwiększonej replikacji VSV w Peli3^{-/-} jest liza i śmierć komórek spowodowana obniżonym wydzielaniem cytokin prozapalnych i IFN typu I [Reniewicz i wsp. 2021].

6. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Białko Pellino3 jest ligazą ubikwityny E3 pełniącą istotną rolę w modulacji wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. Modulując aktywację kinaz białkowych ERK i JNK wpływa na fosforylację czynnika transkrypcyjnego CREB [Butler i wsp. 2005] oraz ekspresję genu kodującego IL1 [Jensen i wsp. 2003], reguluje również ekspresję IFN I indukowaną ligandami receptorów z rodziny TLR [Siednienko i wsp. 2012; Tzieply i wsp. 2012].

Ostatnie badania prowadzone w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu potwierdziły udział ligazy Pellino3 w regulacji szlaku sygnałowego kinaz ERK1/2 indukowanych wirusem VSV. Wyniki badań wykazały, że na poziomie translacji Pellino3 jest pozytywnym regulatorem wydzielania IFN I [Reniewicz i wsp. 2021].

IFN typu I oddziałując z receptorem IFNAR aktywują szlaki sygnałowe JAK-STAT, MAPK oraz NFκB prowadząc do produkcji cytokin: Cxcl10 oraz Cxcl11. Jak dotąd funkcja ligazy ubikwityny Pellino3 w kaskadzie sygnałowej dla IFN typu I nie została poznana. Biorąc pod uwagę wyniki badań pokazujące zdolność ligazy Pellino3 do regulacji aktywacji kinaz MAP i NFκB podjęto próbę określenia funkcji jaką pełni ona w regulacji szlaków sygnałowych aktywowanych przez IFNβ.

Celem pracy było ustalenie funkcji jaką pełni ligaza Pellino3 w IFNAR-zależnej aktywacji kaskady sygnalizacyjnej prowadzącej do produkcji chemokin. Podjęto również próbę identyfikacji kinaz i czynników transkrypcyjnych regulowanych przez Pellino3 determinujących inicjację transkrypcji cytokin aktywowanych przez IFNβ.

Mając na uwadze powszechne wykorzystanie IFN typu I w terapiach antywirusowych [Friedman i Contente, 2010; Utay i Douek, 2016], przeciwnowotworowych [Goldstein i Laszlo, 1988], a także w leczeniu stwardnienia rozsianego [Filipi i Jack, 2020], ważnym wydaje się poznanie nowych mechanizmów regulacji odpowiedzi zależnej od receptora dla interferonu typu I. Poznanie nowych szlaków aktywowanych w odpowiedzi na IFN I umożliwi lepsze zrozumienie ich mechanizmu działania i pozwoli na optymalizację stosowanych terapii.

7. MATERIAŁY I METODY

7.1. MATERIAŁY

7.1.1. ODCZYNNIKI CHEMICZNE I REAGENTY

2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, Hercules, USA
Agaroza	Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy
Bisakrylamid 37,5:1 roztwór 30%	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Albumina surowicy wołowej	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Bambanker	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Niemcy
Błękit trypanu	Bio-Rad, Hercules, USA
Bufor do degradacji genomowego DNA	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Bufor do polimerazy DNA RedTaq 10x	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Chlorek potasu	POCh, Gliwice
Chlorek sodu	POCh, Gliwice
Chloroform	POCh, Gliwice
Deoksycholalan sodu	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Deoksyrybonukleotydy	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, Hedelberg, Niemcy
Etanol	POCh, Gliwice
Glicyna	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Hydrolizat kazeiny	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Interferon β ludzki	R&D Systems, USA
Interferon β myszy	R&D Systems, USA
Izopropanol	POCh, Gliwice
JSH23	Selleck Chemicals, USA

Kazeina 10x	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Koktajl inhibitorów proteaz	Roche Diagnostics GmbH,
cOPMLETE Mini EDTA-free	Manheim, Niemcy
Koktajl inhibitorów fosfataz	Roche Diagnostics GmbH,
PhosSTOP Mini EDTA-free	Manheim, Niemcy
Kwas siarkowy (VI) , H ₂ SO ₄	POCh, Gliwice, Polska
Kwas octowy	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Kwas wersenowy (EDTA)	POCh, Gliwice
Marker Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific,
	Waltham, USA
Medium DMEM/GlutaMAX	Gibco/Thermo Fisher Scientific,
	Waltham, USA
Medium RPMI	Gibco/Thermo Fisher Scientific,
	Waltham, USA
Metanol	POCh, Gliwice
MG132	Selleck Chemicals, USA
Midori Green Advance	Nippon Genetics Europe GmbH,
	Dueren, Niemcy
Molekularne standardy	Bio-Rad, Hercules, USA
cząsteczkowych mas białkowych	
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 cielęca (FBS)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Polimeraza DNA RedTaq	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Ro318220	Selleck Chemicals, USA
Sól fizjologiczna buforowana fosforanem bez jonów wapnia i magnezu (PBS)	Gibco/Thermo Fisher Scientific,
	Waltham, USA
Tris-HCl	Biomedicals, Santa Ana, USA
Trizol-RT	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Trypsyna 10x	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Tween-20	Serva, Hedelberg, Niemcy

Woda wolna od nukleaz
Woda Mili-Q
Wodorofosforan sodu
Wortmannina

Sigma, Steinheim, Niemcy
Łukasiewicz-PORT, Polska
POCh, Gliwice
Selleck Chemicals, USA

7.1.2. BUFORY

4x górny bufor Tris pH 6,8

- 0,5 M Tris pH 6,8
- 0,4% SDS

4x dolny bufor Tris pH 8,8

- 1,5 M Tris pH 8,8
- 0,4% SDS

Bufor elektrodowy do SDS-PAGE

- 25 mM Tris
- 192 mM glicyna
- 0,1% SDS

Bufor do transferu

- 25 mM Tris pH 8,5
- 192 mM glicyna
- 20% methanol

TBS-T

- 50 mM Tris-HCl
- 0,9% NaCl
- 0,05% Tween 20

TBS

- 50 mM Tris-HCl
- 0,9% NaCl

Żel zagęszczający 5% (10ml)

- Bisakrylamid (37,5:1) 3,3 ml
- 4x upper Tris 5 mL
- H₂O 11,6 mL
- 10% APS 60 µl
- TEMED 20 µl

Żel rozdzielający 12% (20ml)

- Bisakrylamid (37,5:1) 10 ml
- 4x lower Tris 6,25 ml
- H₂O 8,75 ml
- 10% APS 130 µl
- TEMED 14 µl

Bufor RIPA

- 50mM Tris-HCl, pH 7,4
- 1% Triton-X
- 0,25% Na-deoksycholalan
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA

TAE

- 40 mM Tris
- 20 mM kwas octowy
- 2 mM EDTA

PBS

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 10 mM Na₂HPO₄
- 1,8 mM KH₂PO₄

PBST

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 10 mM Na₂HPO₄
- 1,8 mM KH₂PO₄
- 0,1% Tween 20

Bufor A do izolacji**frakcji cytozolowej**

- 10mM HEPES, pH 7,9
- 10mM KCl
- 0,1mM EDTA
- 0,1 mM EGTA
- 0,1mM Na₃VO₄

Bufor B do izolacji**frakcji jądrowej**

- 20mM HEPES
- 10mM KCl
- 1mM EDTA
- 1 mM EGTA
- 20mM NaCl
- 20% glicerol

7.1.3. ZESTAWY GOTOWE

Nazwa i przeznaczenie zestawu	Firma, kraj
Zestaw do odwrotnej transkrypcji: iScript Reverse Transcription Supermix for RT-PCR	Bio-Rad, Hercules, USA
Zestaw do reakcji PCR w czasie rzeczywistym: iTaq Uniwersal SYBR Green Supermix	Bio-Rad, Hercules, USA
Zestaw ELISA do oznaczania ludzkiego I-TAC: Human CXCL11/I-TAC DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Zestaw ELISA do oznaczania mysiego I-TAC: Mouse CXCL11/I-TAC DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Zestaw ELISA do oznaczania ludzkiego IP-10: Human CXCL10/IP-10 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Zestaw ELISA do oznaczania mysiego IP-10: Mouse CXCL10/IP-10 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA

Zestaw ELISA do oznaczania ludzkiego MIG: Human CXCL9/MIG DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Zestaw ELISA do oznaczania mysiego MIG: Mouse CXCL9/MIG DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Zestaw do ilościowego oznaczania białka: Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA

7.1.4. PRZECIWCIAŁA

Nazwa przeciwciała	Rozcieńczenie	Firma, kraj
Przeciwciała monoklonalne mysie skierowane przeciwko β -aktynie	1:1 000	Sigma, Steinheim, Niemcy
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie JAK1(Tyr1034/1035)	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko JAK1	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie TYK2(Tyr1054/1055)	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko TYK2	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie STAT1 (Tyr701)	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko STAT1	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie STAT2 (Tyr690)	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko STAT2	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA

Przeciwciało królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie IKK α/β	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko IKK α/β	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie Akt (Ser473)	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko Akt	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie PKC (pan) (β II Ser660)	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko PKC (pan)	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało mysie skierowane przeciwko I κ B- α (H-4)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko IRF9 człowieka	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko IRF9 myszy	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie p65	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko p65	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko RelB	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko c-Rel	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie ERK1/2	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA

Przeciwciało królicze skierowane przeciwko ERK1/2	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie p38	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko p38	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie JNK	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało królicze skierowane przeciwko JNK	1:1 000	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciało mysie skierowane przeciwko nukleolinie C23 (H-250)	1:1 000	Santa Cruz Biotechnology, USA
Przeciwciało ośle skierowane przeciwko łańcuchowi ciężkiemu IgG myszy skoniugowane z fluoroforem IRDye 680W	1:10 000	LiCor, USA
Przeciwciało ośle skierowane przeciwko łańcuchowi ciężkiemu IgG królika skoniugowane z fluoroforem IRDye 800W	1:10 000	LiCor, USA

7.1.5. SEKWENCJE OLIGONUKLEOTYDÓW

Gen	Sekwencja 5' → 3'
<i>Hprt</i>	F: GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCTCGAAG
	R: CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT
<i>Cxcl9</i>	F: GAGGAACCCTAGTGATAAGG
	R: GTTTGATCTCCGTTCTTCAG
<i>Cxcl10</i>	F: GCCATGGTCCTGAGACAAA
	R: AGCTTACAGTACAGAGCTAGGA
<i>Cxcl11</i>	F: CTCAAGGCTTCCTTATGTTC
	R: CGTTACTCGGGTAAATTACAG
<i>HPRT</i>	F: AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC

	R: TTATAGTCAAGGGCATATCC
<i>CXCL9</i>	F: ATTGCTACACTGAAGAATGG
	R: CTCCCACCTTTTAAATCAGTTCC
<i>CXCL10</i>	F: GGAGATGAGCTAGGATAGGATAGAGGG
	R: TGCCCATTTCCTCCAGGACCG
<i>CXCL11</i>	F: CTACAGTTGTTCAAGGCTTC
	R: CACTTTCACCTGCTTTTACCC
<i>Ifnar1</i>	F: TGTTTATGTCAACTGTCAGG
	R: TCCTTCTCCATGCTTATCTTAG
<i>Ifnar2</i>	F: GTACACAGTCATGAGCAAAG
	R: TCCAACCACTTATCTGTCCAC
<i>IFNAR1</i>	F: CAGTTGAAAATGAACTACCTCC
	R: ACTTGAAAGGTCATGTTTGC
<i>IFNAR2</i>	F: CATGTCTTTTGAACCACCAG
	R: CTTAACAATCCCTCTGACTG

7.1.6. LINIE KOMÓRKOWE

BMDM WT

Unieśmiertelnione mysie makrofagi pochodzenia szpikowego typu dzikiego; dzięki uprzejmości prof. Paul'a Moynagh z Uniwersytetu Maynooth;
Hodowla komórek w DMEM, 10% FBS, 100µg/ml Normocyna

BMDM *Peli3*^{-/-}

Unieśmiertelnione mysie makrofagi pochodzenia szpikowego z nokautem genu *Peli3*; dzięki uprzejmości prof. Paul'a Moynagh z Uniwersytetu Maynooth;

	Hodowla komórek w DMEM, 10% FBS, 100µg/ml Normocyna
THP-1 WT	Linia komórkowa ludzkich monocytów typu dzikiego; European Collection of Authenticated Cell Cultures Hodowla komórek w RPMI, 10% FBS, 100µg/ml Normocyna
THP-1 Pellino3 KO	Linia komórkowa ludzkich monocytów z nokautem genu <i>PELI3</i> ; Wyprowadzona z komórek THP-1 typu dzikiego metodą CRISPR-Cas9 w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu (IITD PAN) Hodowla komórek w RPMI, 10% FBS, 100µg/ml Normocyna

7.1.7. APARATURA I AKCESORIA

Nazwa aparatury i akcesoriów	Firma, kraj
Aparat do elektroforezy agarozowej Agagel Midi Wide	Biometra, Niemcy
Aparat do elektroforezy białkowej Mini-PROTEAN®	Bio-Rad, USA
Czytnik płytek Synergy H4	BioTek, Stany Zjednoczone
Czytnik płytek MR5000	Dynatech Laboratories, USA
DRG E-LizaMat X-2	DGR MedTek, Polska
Gel Doc XR+System	Bio-Rad, USA
Inkubator do hodowli komórkowych C 150	Binder, Niemcy

Jednorazowy sprzęt plastikowy: końcówki do pipet, płytki hodowlane, probówki, płytki polistyrenowe, szalki Petriego	Starstedt, Niemcy, Eppendorf, Niemcy, Corning Inc., USA
Komora laminarna klasy II Mars 1200	LaboGene, Dania
Licznik komórek TC20	Bio-Rad, USA
Mikroskop fluorescencyjny	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
Wirówka 5424 R	Sigma, Niemcy
Wirówka 5804 R	Eppendorf, Niemcy
Wirówka stołowa bez chłodzenia Mini Spin	Eppendorf, Niemcy

7.1.8. PROGRAMY KOMPUTEROWE

GraphPad Prism 7

Image Studio ver 2.0

MS Office

GraphPad Software, USA

Li-Cor Biosciences, USA

Microsoft, USA

7.2. METODY

7.2.1. HODOWLA KOMÓREK

Mysie linie komórkowe BMDM WT i BMDM *Peli3*^{-/-} hodowano w medium DMEM/GlutaMAX wzbogaconym 10% płodową surowicą cielęcą z dodatkiem antybiotyku Normocyny (100 µg/ml) w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. W celu przygotowania komórek do doświadczeń zbierano medium z hodowli wyjściowej, następnie komórki płukano PBS (o temperaturze 37°C) i dodawano trypsynę (o temperaturze 37°C), w celu odklejenia adherentnych komórek BMDM od dna butelki hodowlanej. Komórki z trypsyną inkubowano przez 5 minut w 37°C, a następnie hamowano aktywność trypsyny dodając medium DMEM/GlutaMAX w objętości równej objętości enzymu. Po zwirowaniu (5 minut, 300 x g, 22°C) supernatant odrzucano, a komórki zawieszano w medium hodowlanym DMEM/GlutaMAX i liczone przy użyciu licznika komórek TC20. Żywotność komórek oceniano metodą barwienia błękitem trypanu.

Ludzkie linie komórkowe THP-1 WT i THP-1 Pellino3 KO hodowano w medium RPMI 1640 wzbogaconym 10% płodową surowicą cielęcą z dodatkiem antybiotyku Normocyny (100 µg/ml), w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. W celu przygotowania komórek do doświadczeń zbierano zawiesinę hodowli wyjściowej, wirowano (5 minut, 300 x g, 22°C), odrzucono supernatant i zawieszano w medium hodowlanym. Komórki liczone przy użyciu licznika komórek TC20. Żywotność komórek oceniano metodą barwienia błękitem trypanu.

7.2.2. STYMULACJA KOMÓREK

7.2.2.1. PRZYGOTOWANIE KOMÓREK DO REAKCJI PCR ORAZ PCR W CZASIE RZECZYWISTYM

Zawiesinę BMDM WT i *Peli3*^{-/-} w medium DMEM wzbogaconym 10% płodową surowicą cielęcą z dodatkiem antybiotyku Normocyny (100 µg/ml) wysiewano na 6-dołkową płytkę hodowlaną (1,0x10⁶ komórek/dołek). Komórki hodowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Zawiesinę THP-1 WT i Pellino3 KO w medium RPMI wzbogaconym 10% płodową surowicą cielęcą z dodatkiem

antybiotyku Normocyny (100 µg/ml) wysiewano na 6-dołkową płytkę hodowlaną (1,0x10⁶ komórek/dołek). Komórki hodowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂.

Wysiane BMDM WT traktowano przez 4 godziny IFNβ o stężeniach: 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml i 100 ng/ml. Następnie BMDM WT traktowano IFNβ (50 ng/ml) przez 1, 2, 3 oraz 4 godziny.

Wysiane BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano IFNβ o stężeniu 50 ng/ml przez 4 godziny. Eksperymenty powtórzono na modelu ludzkich komórek wykorzystując linię monocytarną THP-1 WT oraz Pellino3 KO.

W kolejnym etapie wysiane BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano przez godzinę inhibitorem NFκB - JSH23 (5 µM) oraz inhibitorem proteasomu 26S - MG132 (5 µM). Następnie komórki traktowano IFNβ o stężeniu 50 ng/ml przez 4 godziny. Podobny schemat powtórzono wykorzystując linię THP-1 WT oraz Pellino3 KO.

Wysiane BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano przez godzinę inhibitorem kinazy PI3K, Wortmanniną (0,5 µM). Następnie komórki traktowano IFNβ o stężeniu 50ng/ml przez 4 godziny. Kolejno wysiane BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano przez godzinę inhibitorem kinazy białkowej C, Ro318220 (1 µM). Komórki traktowano IFNβ o stężeniu 50 ng/ml przez 4 godziny.

We wszystkich doświadczeniach prowadzonych na liniach komórkowych kontrolę stanowiły odpowiednio nietraktowane komórki WT oraz *Peli3*^{-/-} (Pellino3 KO). Każdy eksperyment powtórzono trzykrotnie.

7.2.2.2. PRZYGOTOWANIE KOMÓREK DO TESTU ELISA

Zawiesinę BMDM WT i *Peli3*^{-/-} w medium DMEM wzbogaconym 10% płodową surowicą cielęcą z dodatkiem antybiotyku Normocyny (100 µg/ml)) wysiewano na 6-dołkową płytkę hodowlaną (1,0x10⁶ komórek/dołek). Komórki hodowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie wymieniano medium hodowlane. Zawiesinę THP-1 WT i Pellino3 KO w medium RPMI 1640 wzbogaconym 10% płodową surowicą cielęcą, z dodatkiem antybiotyku Normocyny (100 µg/ml), wysiewano na 6-dołkową płytkę hodowlaną (1,0x10⁶ komórek/dołek). Komórki hodowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂.

Komórki stymulowano IFNβ o stężeniu 50 ng/ml przez 16 godzin. W przypadku eksperymentów z wykorzystaniem inhibitorów (JSH23 5 µM, MG132 5 µM,

Wortmannina 0,5 μ M, Ro318220 1 μ M) dodawano je na 60 minut przed stymulacją IFN β . Następnie zbierano medium hodowlane z nad komórek (w przypadku BMDM) lub zawiesinę komórek (w przypadku THP-1) wirowano (5 minut, 300 x g, 22°C), a uzyskane supernatany rozcieńczano PBS (w objętości 1:1) i umieszczono w probówkach testowych. Każdy eksperyment powtórzono trzykrotnie. We wszystkich doświadczeniach kontrolę stanowiły odpowiednio nietraktowane komórki WT oraz *Peli3*^{-/-} (Pellino3 KO).

7.2.2.3. PRZYGOTOWANIE KOMÓREK DO WESTERN BLOTTING

Zawiesinę BMDM WT i *Peli3*^{-/-} w medium DMEM wzbogaconym 10% płodową surowicą cielęcą z dodatkiem antybiotyku Normocyny (100 μ g/ml) wysiewano na 6-dołkową płytkę hodowlaną (3,0x10⁶ komórek/dołek). Komórki hodowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie wymieniano medium hodowlane.

Zawiesinę THP-1 WT i Pellino3 KO w medium RPMI 1640 wzbogaconym 10% płodową surowicą cielęcą z dodatkiem antybiotyku Normocyny (100 μ g/ml) wysiewano na 6-dołkową płytkę hodowlaną (1,0x10⁶ komórek/dołek). Komórki hodowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂.

BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano IFN β (50 ng/ml) przez określony czas: 5, 15, 30, 60 i 90 minut. Po zakończonej stymulacji komórek medium hodowlane usunięto, przepłukano zimnym buforem PBS i przeprowadzono lizę komórek w buforze RIPA z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz. Eksperymenty powtórzono wykorzystując linie THP-1 WT oraz Pellino3 KO. Z uwagi na fakt, że komórki te rosną w zawiesinie, po skończonym traktowaniu zawiesinę zebrano, wirowano (5 minut, 300 x g, 22°C), supernatanty odrzucano, a hodowlę przepłukano zimnym buforem PBS i przeprowadzono lizę komórek w buforze RIPA z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz. We wszystkich doświadczeniach kontrolę stanowiły komórki nietraktowane.

W celu określenia translokacji czynników transkrypcyjnych do jądra komórkowego BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano IFN β (50ng/ml) przez 60 i 90 minut. W doświadczeniach pozostawiono jeden dołek jako kontrolę z nietraktowanymi komórkami typu dzikiego oraz *Peli3*^{-/-}. Po skończonej stymulacji usunięto medium, hodowlę przepłukano zimnym buforem PBS i przeprowadzono izolację frakcji jądrowej, którą szczegółowo opisano w rozdziale 7.2.4.2 na stronie 57. W przypadku rosnących

w zawieszynie komórek THP-1 WT oraz Pellino3 KO po skończonym traktowaniu komórki wirowano (5 minut, 300 x g, 22°C), supernatanty odrzucano, zawieszinę przepłukano zimnym buforem PBS i przeprowadzono izolację frakcji jądrowej, którą szczegółowo opisano w rozdziale 7.2.4.2 na stronie 57.

7.2.3. BADANIE EKSPRESJI GENÓW

7.2.3.1. IZOLACJA CAŁKOWITEGO RNA

Izolację całkowitego RNA z komórek wykonano przy użyciu odczynnika TRIzol® RT. Po stymulacji zebrano i odrzucono medium z nad BMDM WT i Peli3^{-/-}, a następnie bezpośrednio na płycie hodowlanej wykonano lizę komórek poprzez dodanie odczynnika TRIzol® RT (0,5 ml odczynnika na każde 1,0 x10⁶ komórek). W przypadku THP-1 WT i Pellino3 KO, komórki po zakończonej stymulacji zbierano i wirowano (5 minut, 300 x g, 22°C), supernatanty odrzucano, a uzyskany osad komórek zawieszano w odczynniku TRIzol® RT (0,5 ml odczynnika do na każde 1,0 x10⁶ komórek). Po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej lizaty przenoszono do sterylnych probówek umieszczonych na lodzie, dodawano chloroform (0,1 ml chloroformu na każde 0,5 ml lizatu) i dokładnie mieszano poprzez wstrząśnięcie probówek. Próbkę inkubowano 3 minuty, a następnie wirowano przez 15 minut przy 12000 x g w 4°C. Po wirowaniu w probówkach otrzymano 3 fazy. Do nowych, sterylnych probówek pobierano górną (wodną) fazę zawierającą całkowite RNA, a pozostałe fazy odrzucano. Aby strącić RNA dodawano taką samą objętość izopropanolu, jak objętość zebranej frakcji. Probówki wstrząsano i inkubowano w temperaturze 4°C przez 10 minut, a następnie wirowano przez 10 minut przy 12000 x g w 4°C. Supernatant odrzucano, a powstały osad płukano dwukrotnie 0,5 ml 75% etanolu i ponownie wirowano (5 minut, 7500 x g, 4°C). Uzyskany osad suszono, a następnie zawieszano w 20 µl wody wolnej od RNaz i przechowywano w -80°C.

7.2.3.2. OCENA CZYSTOŚCI I POMIAR STĘŻENIA RNA

Pomiar stężenia RNA, a także stosunków absorbancji A260/A280 i A260/A230, wykonano z wykorzystaniem nanofotometru. Do dalszych eksperymentów wykorzystywano próbki dla których wartości stosunków absorbancji roztworów wodnych RNA znajdowały się w przedziale 1,7-2,0.

7.2.3.3. DEGRADACJA GENOMOWEGO DNA

Aby oczyścić całkowite RNA z zanieczyszczeń pochodzących z genomowego DNA pobierano 1 µg całkowitego RNA, dodawano bufor do degradacji genomowego DNA (1µl) oraz deoksyrybonukleazę I (1µl). Uzupełniano wodą wolną od RNaz tak aby końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10µl. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 30 minut w 37°C. W celu zatrzymania reakcji dodawano 50 mM EDTA (1µl) i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 65°C.

7.2.3.4. ODWROTNA TRANSKRYPCJA NA MATRYCY RNA

Do reakcji odwrotnej transkrypcji na matrycy RNA użyto zestaw iScript™ RT Supermix. Do 1 µg całkowitego RNA (po degradacji genomowego DNA) dodawano 4 µl iScript RT Supermix i mieszaninę reakcyjną dopełniano do 20 µl wodą wolną od nukleaz. Następnie próbki inkubowano:

- 1) 5 minut w 25°C
- 2) 20 minut w 46°C
- 3) 1 minutę w 95°C.

Po zakończeniu reakcji odwrotnej transkrypcji próbki przenoszono na lód, a otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

7.2.3.5. AMPLIFIKACJA SWOISTYCH FRAGMENTÓW cDNA (REAKCJA PCR)

Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze gradientowym wykorzystując Polimerazę DNA RedTaq i postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Do probówek dodawano po 3µl cDNA (otrzymanego w reakcji odwrotnej transkrypcji), 2 µl 10x stężonego buforu do PCR, 200 µM deoksynukleotydy (dNTP), po 0,5 µM starterów, a następnie dodawano odpowiednią ilość wody, aby otrzymać końcową objętość 20 µl. Reakcja przebiegła według następującego schematu:

- 1) wstępna denaturacja matrycy (95°C przez 3 minuty)
- 2) denaturacja (95°C przez 30 sekund)
- 3) łączenie starterów (60°C przez 60 sekund)
- 4) synteza (72°C przez 60 sekund)
- 5) pętla od 2 do 4 przez 40 cykli
- 6) wydłużona synteza (72°C przez 5 minut)
- 7) schłodzenie do 4 °C.

7.2.3.6. ELEKTROFOREZA W ŻELU AGAROWYM

Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym używając buforu elektrodowego TAE. Na żel nanoszono po 20 µl produktu PCR oraz 3µl markera GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 90V przez 30-45 minut, w aparacie Agagel Midi-Wide. Próbkę po rozdziale elektroforetycznym wizualizowano używając aparatu Gel Doc XR+System.

7.2.3.7. AMPLIFIKACJA FRAGMENTÓW DNA Z DETEKcją W CZASIE RZECZYWISTYM (REAL-TIME PCR)

Do reakcji PCR w czasie rzeczywistym użyto zestaw iTaq Uniwersal SYBR Green Supermix oraz aparat CFX Connect. Na 96-dołkową płytkę nanoszono 10 ng cDNA (w objętości 2,5 µl), następnie dodawano startery o końcowym stężeniu 0,4 µM (po 1,25µl) oraz iTaq Uniwersal SYBR Green Supermix (5 µl). Każdą z mieszanin reakcyjnych przygotowywano w 2 powtórzeniach. Reakcję PCR prowadzono według następującego schematu:

-
- 1) aktywacja polimerazy (30 sekund, 95°C)
 - 2) denaturacja matrycy (10 sekund, 95°C)
 - 3) hybrydyzacja starterów (15 sekund, 60°C)
 - 4) elongacja (15 sekund, 72°C)
 - 5) odczyt fluorescencji
 - 6) pętla od 2 do 5 – 40 powtórzeń.

Otrzymane wyniki normalizowano względem endogennej kontroli genu fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (HPRT), a do analizy wyników zastosowano metodę $2^{-\Delta\Delta CT}$ [Livak i wsp. 2001].

7.2.4. WESTERN BLOTTING

7.2.4.1. LIZA KOMÓREK W BUFORZE RIPA

Lizę komórek wykonano przy użyciu buforu RIPA (z dodatkiem inhibitorów fosfataz i proteaz). Po określonym czasie stymulacji komórek zbierano i odrzucano supernatanty znad BMDM, a w przypadku THP-1 zbierano zawiesiny komórek i wirowano (5 minut, 300 x g, 22°C). Następnie do komórek dodawano bufor RIPA (0,1ml buforu RIPA na dołek) i inkubowano w temperaturze 4°C przez 30 minut. Po tym czasie lizaty zbierano do sterylnych probówek, wirowano (5 minut, 1000 x g, 4°C), a otrzymane supernatanty przenoszono do nowych probówek. Lizaty przechowywano w temperaturze -80°C.

7.2.4.2. LIZA KOMÓREK W BUFORACH DO IZOLACJI FRAKCJI JĄDROWEJ

Lizę komórek wykonano przy użyciu buforów A i B do izolacji frakcji cytozolowej i jądrowej. Po stymulacji komórek zbierano i odrzucano supernatanty znad BMDM, a w przypadku THP-1 zawiesiny komórek zbierano i wirowano (5 minut, 300 x g, 22°C), supernatanty odrzucano, a komórki przepłukiwano zimnym PBS. Następnie do komórek dodawano bufor A do izolacji frakcji cytozolowej (100 µl buforu na każde dwa dołki) i inkubowano w temperaturze 4°C przez 15 minut. Lizaty zbierano do sterylnych probówek i wirowano (1 minuta, 12000 x g, 4°C). Otrzymane supernatanty (frakcja cytozolowa) odrzucano, a osad (jądra komórkowe) ponownie płukano buforem A i

wirowano (1 minuta, 12000 x g, 4°C). Po odrzuceniu supernatantu do osadu dodawano bufor B do izolacji frakcji jądrowej (80 µl buforu na każde dwa dołki). Probówki wytrząsano przez 30 minut w temperaturze 4°C. Następnie lizaty wirowano (10 minut, 12000 x g, 4°C), a otrzymane supernatanty (frakcja jądrowa) przenoszono do sterylnych probówek. Frakcje jądrowe przechowywano w temperaturze -80°C.

7.2.4.3. OZNACZENIE STĘŻENIA BIAŁKA METODĄ BCA

Oznaczenie stężenia białka przeprowadzono z użyciem zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Przygotowano roztwór BSA o stężeniu 2 mg/ml. Na 96-dołkową płytkę naniesiono: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 µl roztworu BSA oraz po 2 µl próbki, w dwóch powtórzeniach. Następnie dodano po 200 µl mieszaniny składającej się z buforu A i B do oznaczania stężenia białka, przygotowanej zgodnie z zaleceniami producenta. Płytkę wytrząsano przez 30 sekund i inkubowano 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie odczytano absorbancję przy $\lambda=562$ nm za pomocą czytnika Synergy H4. Stężenie białka wyznaczano na podstawie krzywej kalibracyjnej, wykorzystując wzorcowe roztwory BSA.

7.2.4.4. ELEKTROFOREZA SDS-PAGE

Próbki zawieszono w buforze Leammli oraz dodano β -merkaptoetanol o końcowym stężeniu 5%, a następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze 99°C. Na żel poliakrylamidowy (żel zagęszczający 5%, żel rozdzielający 12%) nanoszono 15 µg badanej próbki. Elektroforezę w warunkach denaturujących prowadzono w aparacie do elektroforezy Mini-PROTEAN przy napięciu 80V dla żelu zagęszczającego, a następnie przy napięciu 125V dla żelu rozdzielającego, w buforze do elektroforezy SDS-PAGE. Po zakończonej elektroforezie żele dokładnie płukano w wodzie destylowanej, aby odpłukać pozostałości SDS.

7.2.4.5. ELEKTROTRANSFER BIAŁEK

Mokry elektrotransfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową prowadzono przy stałym napięciu 0,2 A przez 1 godzinę i 45 minut, w temperaturze pokojowej, w buforze do transferu [Towbin i wsp. 1979].

7.2.4.6. DETEKCJA BIAŁEK IMMOBILIZOWANYCH NA BŁONIE NITROCELULOZOWEJ

Po przeprowadzonym elektrotransferze, w celu zablokowania oddziaływań nieswoistych, membranę nitrocelulozową blokowano przez dwie godziny roztworem kazeiny w temperaturze pokojowej. Następnie membranę płukano 3-krotnie buforem TBS-T przez 10 minut. Po odpłukaniu resztek roztworu kazeiny dodawano przeciwciała pierwszorzędowe skierowane przeciwko badanym białkom i inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 4°C. Po zakończonej inkubacji membranę nitrocelulozową płukano 3-krotnie buforem TBS-T przez 10 minut, a następnie inkubowano z roztworem przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z fluorochromem (IRD 700 i 800 LiCor) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Wizualizację membrany nitrocelulozowej prowadzono przy użyciu aparatu ODYSSEY CLx.

7.2.5. TEST ELISA

Test ELISA wykonywano wykorzystując zautomatyzowany system pipetujący DRG E-LizaMat X-2 według instrukcji producenta zestawów do testu ELISA, zawierających następujące odczynniki:

Cytokina	Odczynnik	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe
Cxcl9	Kozie przeciwciała pierwszorzędowe przeciwko myszy (Capture Antibody) rozpuszczone w buforze PBS	100 µg/ml	800 ng/ml
	Biotynylowane kozie przeciwciała przeciwko myszy (Detection Antibody) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	12 µg/ml	200 ng/ml
	Rekombinowane mysie białko MIG (Standard) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	80 ng/ml	15,6 - 1000 pg/ml

	Koniugat awidyna-HRP (Streptavidin-HRP B) rozpuszczony w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	-	40-krotne rozcieńczenie
Cxcl10	Szczurze przeciwciało pierwszorzędowe przeciwko myszy (Capture Antibody) rozpuszczone w buforze PBS	240 µg/ml	2 µg/ml
	Biotynylowane kozie przeciwciało przeciwko myszy (Detection Antibody) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	6 µg/ml	100 ng/ml
	Rekombinowane mysie białko IP-10 (Standard) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	150 ng/ml	62,5-4000 pg/ml
	Koniugat awidyna-HRP (Streptavidin-HRP B) rozpuszczony w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	-	40-krotne rozcieńczenie
Cxcl11	Kozie przeciwciało pierwszorzędowe przeciwko myszy (Capture Antibody) rozpuszczone w buforze PBS	72 µg/ml	400 ng/ml
	Biotynylowane kozie przeciwciało przeciwko myszy (Detection Antibody) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	18 µg/ml	100 ng/ml
	Rekombinowane mysie białko I-TAC (Standard) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	12 ng/ml	62,5-4000 pg/ml
	Koniugat awidyna-HRP (Streptavidin-HRP B) rozpuszczony w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	-	200-krotne rozcieńczenie
CXCL9	Mysie przeciwciało pierwszorzędowe przeciwko człowiekowi (Capture Antibody) rozpuszczone w buforze PBS	720 µg/ml	6 ng/ml

	Biotynylowane kozie przeciwciała przeciwko człowiekowi (Detection Antibody) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	12 µg/ml	200 ng/ml
	Rekombinowane ludzkie białko MIG (Standard) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	850 ng/ml	62,5-4000 pg/ml
	Koniugat awidyna-HRP (Streptavidin-HRP B) rozpuszczony w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	-	40-krotne rozcieńczenie
CXCL10	Mysie przeciwciała pierwszorzędowe przeciwko człowiekowi (Capture Antibody) rozpuszczone w buforze PBS	240 µg/ml	2 µg/ml
	Biotynylowane kozie przeciwciała przeciwko myszy (Detection Antibody) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	0,75 µg/ml	12,5 ng/ml
	Rekombinowane ludzkie białko IP-10 (Standard) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	110 ng/ml	31,2-2000 pg/ml
	Koniugat awidyna-HRP (Streptavidin-HRP B) rozpuszczony w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	-	40-krotne rozcieńczenie
CXCL11	Mysie przeciwciała pierwszorzędowe przeciwko człowiekowi (Capture Antibody) rozpuszczone w buforze PBS	180 µg/ml	1 µg/ml
	Biotynylowane kozie przeciwciała przeciwko myszy (Detection Antibody) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	11,2 µg/ml	62,5 ng/ml
	Rekombinowane ludzkie białko I-TAC (Standard) rozpuszczone w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	60 ng/ml	7,81-500 pg/ml

	Koniugat awidyna-HRP (Streptavidin-HRP B) rozpuszczony w 1% roztworze BSA (w buforze PBS)	-	200-krotne rozcieńczenie
--	---	---	--------------------------

Test ELISA rozpoczęto od przygotowania przeciwciała pierwszorzędowego, o odpowiednim stężeniu (Tab. 7.1.). 96-dołkową płytkę polistyrenową MaxiSorp opłaszczano przeciwciałem pierwszorzędowym, poprzez dodanie 100 µl roztworu przeciwciał na dołek i inkubowano przez 16 godzin w temperaturze pokojowej, w ciemności. W kolejnym etapie testu zbierano roztwory przeciwciał pierwszorzędowych z każdego dołka płytki i 3-krotnie przepłukano buforem PBS-T. Aby zablokować miejsca nieswoiście wiążące immunoglobuliny do każdego dołka płytki dodawano po 300 µl buforu blokującego (1% roztwor BSA w PBS), a następnie inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. W tym czasie przygotowywano szereg rozcieńczeń standardu tj. rekombinowanego białka ludzkiego i mysiego Cxcl9 (CXCL9), Cxcl10 (CXCL10), Cxcl11 (CXCL11). Rozcieńczenia przygotowywano w 1% roztworze BSA w PBS. Po upływie 1 godziny od dodania buforu blokującego, bufor zbierano, a płytkę 3-krotnie przepłukiwano buforem PBS-T. Następnie наносono po 100 µl przygotowanych rozcieńczeń rekombinowanego białka, a także po 100 µl badanych próbek. Płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Po 3-krotnym płukaniu płytki buforem PBS-T наносono po 100 µl biotynylowanych przeciwciał i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Płytkę ponownie 3-krotnie płukano buforem PBS-T, a następnie dodawano po 100 µl koniugatu awidyna-HRP o stężeniu podanym w Tab. 7.1. Detekcję cytokin prowadzono z użyciem substratu, mierząc absorbancję przy długości fali $\lambda=450$ nm. Stężenie cytokin odczytano z krzywej standardowej.

7.2.6. ANALIZA STATYSTYCZNA

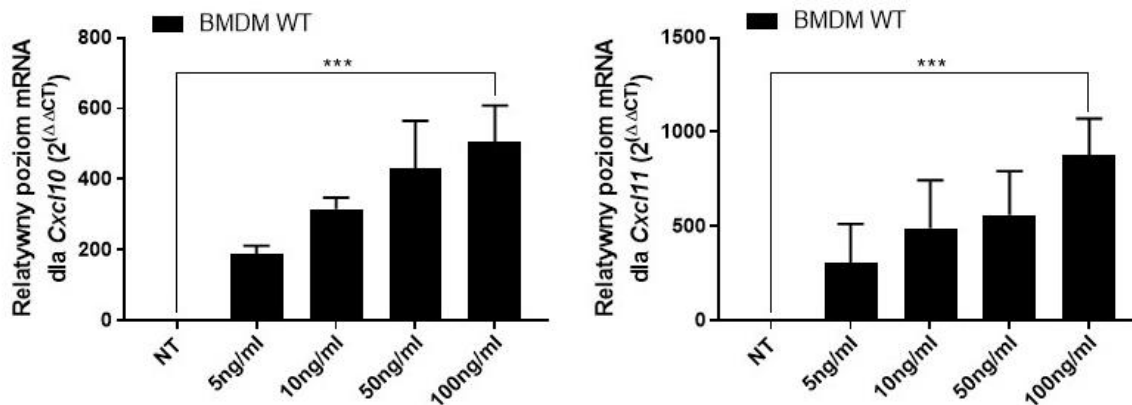
Analizę statystyczną i wykresy wykonano wykorzystując program GraphPad Prism 7. Otrzymane wyniki zostały wyrażone jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe, wykorzystując trzy niezależne powtórzenia eksperymentów. Różnice między dwoma badanymi grupami oceniano za pomocą testu t-Studenta przyjmując za istotne statystycznie wartości $p<0,05$. Wartości p oznaczono jako: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

8. WYNIKI

Pellino3 pełni funkcję regulatora odpowiedzi antywirusowej oraz antybakteryjnej wpływając na ekspresję IFN typu I w szlakach przekazywania sygnału zależnych od receptorów TLR3 i TLR4 [Siednienko i wsp. 2014; Tzieply i wsp. 2012]. Jednakże jak do tej pory mechanizm działania tej ligazy w szlaku przekazywania sygnału aktywowanym przez IFN I nie został poznany. Biorąc pod uwagę dane literaturowe, które sugerują, że Pellino3 reguluje wydzielanie IFN typu I w kaskadach sygnalizacyjnych indukowanych wirusami, badania rozpoczęto od określenia wpływu IFN β na ekspresję genów *Cxcl9* (*CXCL9*), *Cxcl10* (*CXCL10*) oraz *Cxcl11* (*CXCL11*), kodujących chemokiny odpowiedzialne za migrację komórek układu odpornościowego do miejsca toczącej się infekcji. Mysi model badawczy stanowiły BMDM, mysie makrofagi różnicowane ze szpiku kostnego. Jako ludzki model badawczy wykorzystano monocytarną linię komórek THP-1, wywodzącą się z ostrej białaczki monocytowej. W celu aktywacji receptora dla IFN typu I wykorzystano odpowiednio rekombinowany mysy oraz ludzki IFN β .

8.1. WPŁYW STĘŻENIA IFN β NA INDUKCJĘ EKSPRESJI WYBRANYCH GENÓW

W pierwszej kolejności określono wpływ stężenia IFN β na pobudzenie mysich makrofagów. W tym celu komórki BMDM WT traktowano przez 4 godziny różnymi stężeniami IFN β : 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml oraz 100 ng/ml. Następnie zmiany w ekspresji genów kodujących geny *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11* określono metodą PCR w czasie rzeczywistym.

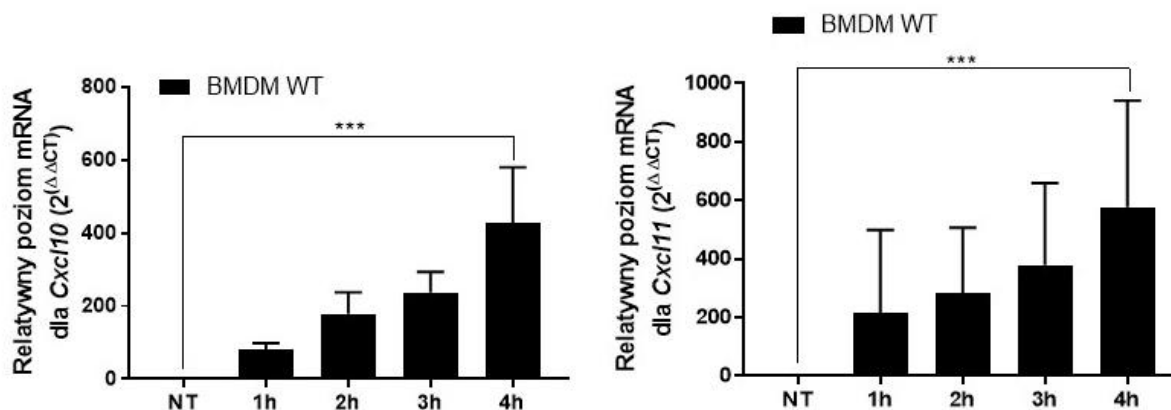


Rys. 8.1. Poziom ekspresji genów kodujących *Cxcl10*, *Cxcl11* w BMDM WT w odpowiedzi na IFN β . Komórki traktowano przez 4h IFN β o określonym stężeniu. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczano relatywny poziom ekspresji genów *Cxcl10*, *Cxcl11*. Jako genu referencyjnego użyto *Hprt1*. *** $p < 0,001$.

Wykazano, że w BMDM WT dochodzi do wzrostu ekspresji genów kodujących *Cxcl10* i *Cxcl11* w pełnym zakresie stężeń wykorzystanego liganda. Stężenie 50 ng/ml okazało się granicznym, wyższe nie dały istotnego wzrostu pobudzenia ekspresji. W związku z tym, stężenie 50 ng/ml zostało wytypowane do dalszych eksperymentów.

Z uwagi na niski, poza progiem czułości RT-PCR, poziom ekspresji genu *Cxcl9* w komórkach nietraktowanych IFN β , niemożliwa okazała się analiza ekspresji genu *Cxcl9* metodą 2^{-ΔΔCT}.

Następnie zbadano kinetykę aktywacji BMDM traktowanych IFN β , określając poziom ekspresji genów kodujących *Cxcl10* oraz *Cxcl11* w czasie. W tym celu, BMDM WT traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 1, 2, 3 i 4 godziny. Zmiany w ekspresji genów kodujących białka *Cxcl10* oraz *Cxcl11* określono metodą PCR w czasie rzeczywistym.

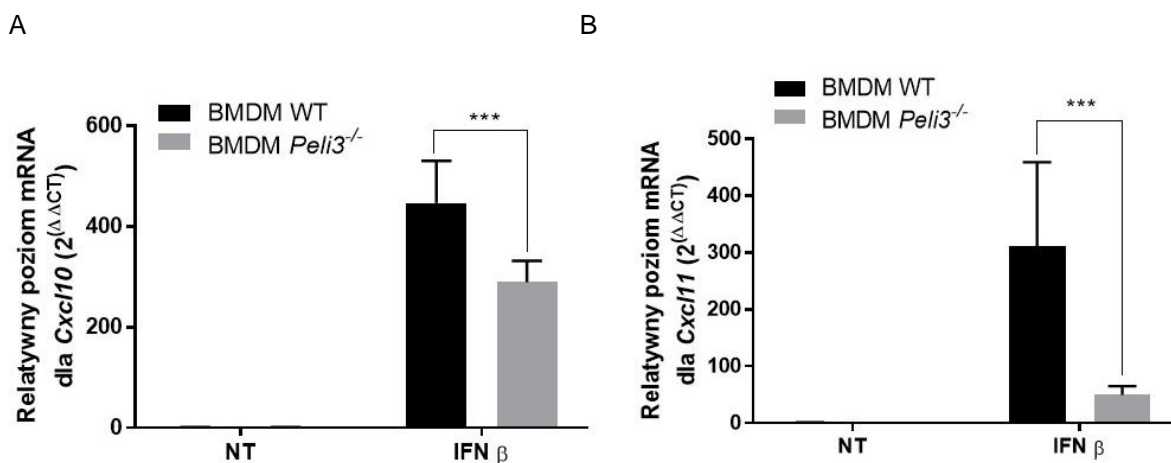


Rys. 8.2. Kinetyka zmian ekspresji genów kodujących *Cxcl10*, *Cxcl11* w BMDM WT w odpowiedzi na $IFN\beta$. Komórki traktowano $IFN\beta$ w stężeniu 50 ng/ml przez 1, 2, 3 i 4h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczano relatywny poziom ekspresji genów *Cxcl10*, *Cxcl11*. Jako genu referencyjnego użyto *Hprt1*. *** $p < 0,001$.

Wykazano, że w BMDM WT dochodzi do wzrostu ekspresji genów kodujących *Cxcl10* i *Cxcl11* w odpowiedzi na traktowanie komórek $IFN\beta$ o stężeniu 50 ng/ml, a najwyższy poziom mRNA dla badanych cytokin zaobserwowano po 4 godzinach stymulacji (Rys. 8.2.). W związku z tym taki punkt czasowy został wytypowany do dalszych badań.

8.2. WPŁYW LIGAZY UBIKWITYNY PELLINO3 NA EKSPRESJĘ WYBRANYCH GENÓW W ODPOWIEDZI NA $IFN\beta$

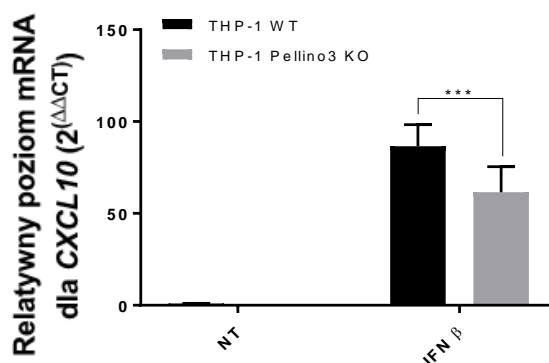
W kolejnym etapie badań określono wpływ białka Pellino3 na ekspresję genów, *Cxcl10* i *Cxcl11* w odpowiedzi na traktowanie komórek BMDM i THP-1 $IFN\beta$. W tym celu komórki BMDM WT oraz *Peli3*^{-/-} traktowano $IFN\beta$ o stężeniu 50 ng/ml przez 4 godziny. Zmiany w ekspresji genów dla badanych cytokin określono metodą PCR w czasie rzeczywistym.



Rys. 8.3. Poziom ekspresji genów kodujących *Cxcl10*, *Cxcl11* w BMDM WT i BMDM *Peli3*^{-/-} w odpowiedzi na IFN β . Komórki traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 4h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczano relatywny poziom ekspresji genów *Cxcl10*, *Cxcl11*. Jako genu referencyjnego użyto *Hprt1*. *** $p < 0,001$.

Otrzymane wyniki pokazują zmniejszoną o 1/3 ekspresję genu *Cxcl10* w BMDM *Peli3*^{-/-} w stosunku do WT (Rys. 8.3. A) oraz 6-krotny spadek ekspresji genu *Cxcl11* w BMDM *Peli3*^{-/-} w porównaniu do WT (Rys. 8.3. B).

Wpływ białka Pellino3 na ekspresję wybranych genów w odpowiedzi na IFN β zbadano również w komórkach ludzkich. W tym celu, komórki THP-1 WT i Pellino3 KO traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 4 godziny. Zmiany w ekspresji genów *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11* określono metodą PCR w czasie rzeczywistym.



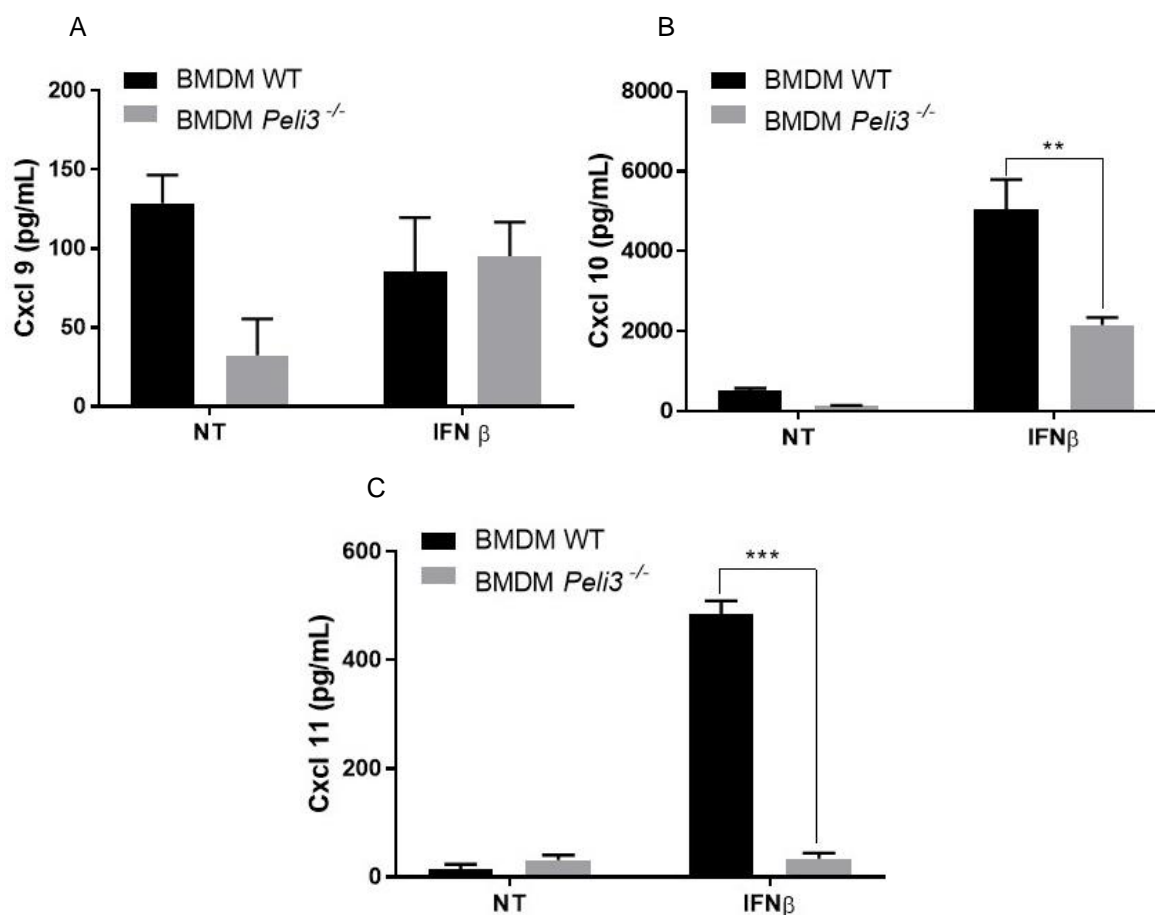
Rys. 8.4. Poziom ekspresji genów kodujących *CXCL10* w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β . Komórki traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 4h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczano relatywny poziom ekspresji genów *CXCL10*. Jako genu referencyjnego użyto *HPRT1*. *** $p < 0,001$.

Otrzymane wyniki pokazują zmniejszoną o 1/3 ekspresję *CXCL10* w THP-1 Pellino3 KO w porównaniu do komórek WT (Rys. 8.4.).

Ze względu na niewykrywalny poziom ekspresji genu *CXCL9* oraz *CXCL11* w komórkach nietraktowanych $IFN\beta$, niemożliwe było wyznaczenie relatywnego poziomu mRNA dla tych cytokin.

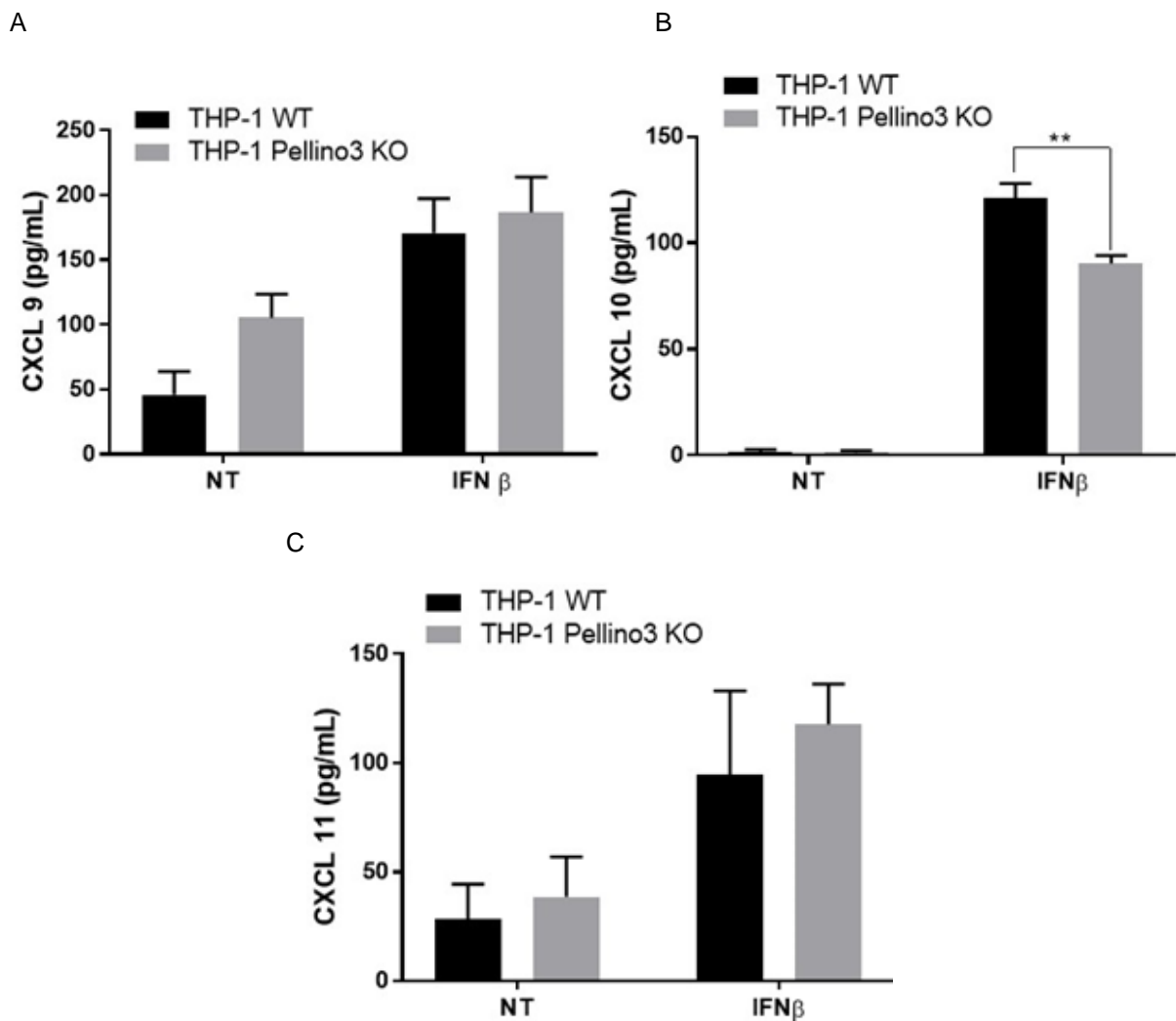
8.3. WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA WYDZIELANIE WYBRANYCH CYTOKIN, W ODPOWIEDZI NA $IFN\beta$

Aby potwierdzić udział Pellino3 w wydzielaniu cytokin *Cxcl10* i *Cxcl11* w odpowiedzi na $IFN\beta$, komórki BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano $IFN\beta$ o stężeniu 50 ng/ml przez 16 godzin. Następnie przeprowadzono test immunoenzymatyczny (ELISA), aby określić stężenie cytokin wydzielonych przez komórki do medium hodowlanego.



Rys. 8.5. Poziom wydzielanych cytokin *Cxcl9*, *Cxcl10* i *Cxcl11* w BMDM WT i *Peli3*^{-/-}, w odpowiedzi na $IFN\beta$. Komórki traktowano $IFN\beta$ o stężeniu 50 ng/ml przez 16h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie pobrano medium i przeprowadzono test ELISA. ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Otrzymane wyniki pokazują zmniejszenie wydzielania cytokiny Cxcl10 o ponad 1/2 w BMDM *Peli3*^{-/-} w stosunku do komórek WT (Rys. 8.5. B) oraz całkowite zahamowanie wydzielania cytokiny Cxcl11 w BMDM *Peli3*^{-/-} (Rys. 8.5. C). Nie zaobserwowano różnic w poziomie wydzielania cytokiny Cxcl9 (Rys. 8.5. A). Analogiczne testy wykonano wykorzystując komórki THP-1 WT i Pellino3 KO.

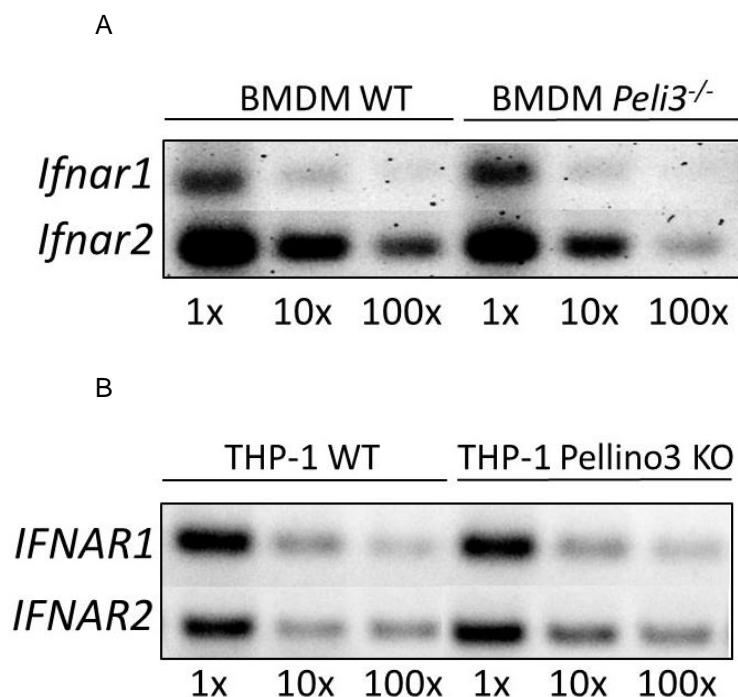


Rys. 8.6. Poziom wydzielanych cytokin CXCL9, CXCL10 oraz CXCL11 w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β . Komórki traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 16h. Kontrolę stanowią komórki nietraktowane (NT). Następnie pobrano medium i przeprowadzono test ELISA. ** p<0,01.

Otrzymane wyniki pokazują spadek wydzielania cytokiny CXCL10 w THP-1 Pellino3 KO w porównaniu z THP-1 WT o około 1/3 (Rys. 8.6. B). Nie zaobserwowano różnic w poziomie wydzielania CXCL9 oraz CXCL11 (Rys. 8.6. A, C).

8.4. ANALIZA EKSPRESJI GENÓW KODUJĄCYCH PODJEDNOSTKI RECEPTORA IFNAR W KOMÓRKACH Z NOKAUTEM GENU DLA PELLINO3

W kolejnym etapie sprawdzono czy nokaut genu dla białka Pellino3 wpływa na poziom ekspresji genów kodujących receptor dla IFN I w komórkach BMDM oraz THP-1. W tym celu przeprowadzono reakcję PCR na uzyskanej z badanych komórek matrycy cDNA, rozcieńczonej 1, 10 i 100x. Następnie otrzymane produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym z dodatkiem Midori Green Advance.



Rys. 8.7. Poziom ekspresji genów *Ifnar1* i *Ifnar2* (A) w BMDM WT i *Peli3*^{-/-} oraz genów *IFNAR1* i *IFNAR2* (B) w THP-1 WT i Pellino3 KO Z komórek izolowano całkowite RNA, które poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji. Amplifikację poszczególnych fragmentów prowadzono stosując jako matrycę cDNA rozcieńczone 1, 10 i 100x. Produkty reakcji PCR rozdzielono w 2% żelu agarozowym, a następnie wizualizowano w aparacie Gel Doc XR+System.

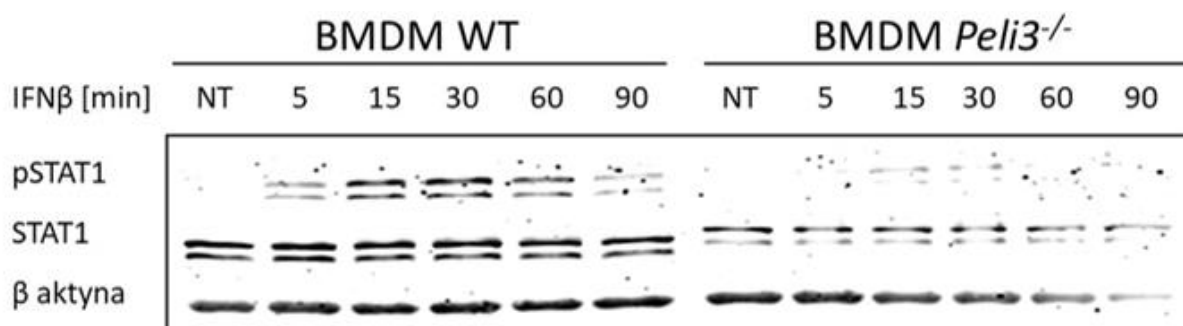
Otrzymane wyniki pokazują, że nokaut genu kodującego ligazę Pellino3 nie ma wpływu na ekspresję genów kodujących podjednostki receptora dla IFN typu I w obydwu typach komórek (Rys. 8.7. A i B).

8.5. WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA AKTYWACJĘ KINAZ BIAŁKOWYCH I CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH AKTYWOWANYCH PRZEZ IFN β

W następnym etapie badań postanowiono wyjaśnić mechanizm działania białka Pellino3 prowadzący do obniżenia produkcji cytokin.

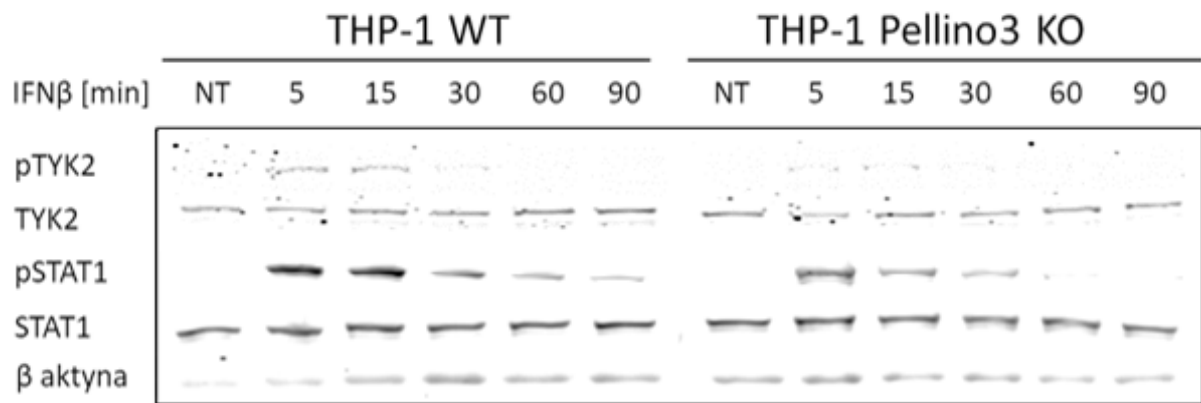
8.5.1. WPŁYW PELLINO3 NA AKTYWACJĘ KINAZ BIAŁKOWYCH I CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH SZLAKU SYGNAŁOWEGO JAK-STAT

Aby ocenić czy białko Pellino3 reguluje transdukcję genów *Cxcl10*, *CXCL10* i *Cxcl11* na poziomie szlaku JAK-STAT, analizowano poziom fosforylacji JAK1 i TYK2 oraz STAT1 i STAT2 w komórkach BMDM i THP-1 wykorzystując technikę Western Blotting. Uzyskane wyniki skorelowano z całkowitą ilością badanych kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych oraz całkowitą ilością białka w komórce reprezentowaną przez ilość β aktyny w lizatach komórkowych. Wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanej formie mysiego i ludzkiego STAT1 (Tyr701) oraz przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanej formie ludzkiej TYK2 (Tyr1054/1055).



Rys. 8.8. Analiza aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT1 w BMDM WT oraz *Peli3*^{-/-} w odpowiedzi na IFN β . BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml we wskazanych punktach czasowych, wyrażonych w minutach. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Komórki lizowano na lodzie, a następnie zmierzono ilość białka w próbach przy użyciu testu BCA. Próby (zawierające 15 μ g białka) oraz białkowy standard masy rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę wykorzystując elektrotransfer. Detekcję białek prowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych oraz skierowanych przeciwko nim przeciwciał sprzężonych z fluorochromem w zakresie podczerwieni, a następnie wizualizowano w aparacie Odyssey CLx. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.

Uzyskane wyniki wykazały, że podczas stymulacji komórek BMDM IFN β dochodzi do aktywacji i fosforylacji STAT1 zarówno w komórkach WT, jak i z delecją w genie kodującym białko Pellino3 (Rys. 8.8.). W BMDM WT STAT1 jest fosforylowany w 5 minucie stymulacji komórek IFN β , a w BMDM *Peli3*^{-/-} wyraźna fosforylacja STAT1 obserwowana jest dopiero po 15 minutach stymulacji. W BMDM *Peli3*^{-/-} fosforylacja zanika po 60 minutach stymulacji komórek IFN β , a w komórkach WT fosforylacja nie zanika. Otrzymane wyniki wykazały obniżony poziom fosforylacji STAT1 w komórkach *Peli3*^{-/-} w porównaniu do komórek WT. Na membranie nitrocelulozowej nie zaobserwowano detekcji sygnału pochodzącego od kinazy JAK1 w BMDM traktowanych IFN β .



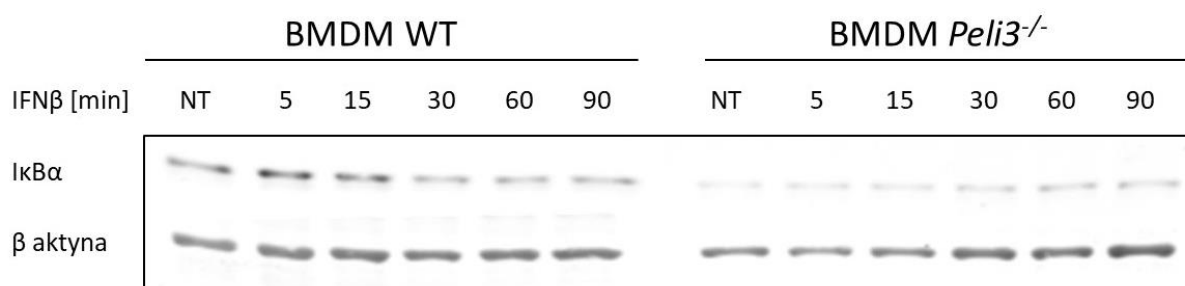
Rys. 8.9. Analiza aktywacji kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych w THP-1 WT oraz Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β . THP-1 WT i Pellino3 KO traktowano IFN β o stężeniu 50ng/ml we wskazanych punktach czasowych, wyrażonych w minutach. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Komórki lizowano na lodzie, a następnie zmierzono ilość białka w próbach przy użyciu testu BCA. Próby (zawierające 15 μ g białka) oraz białkowy standard masy rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę wykorzystując elektrotransfer. Detekcję białek prowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych oraz skierowanych przeciwko nim przeciwciał sprzężonych z fluorochromem w zakresie podczerwieni, a następnie wizualizowano w aparacie Odyssey CLx. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.

Wyniki badań przeprowadzonych na linii THP-1 wykazały, że do aktywacji i fosforylacji TYK2 oraz STAT1 dochodzi po 5 minutach stymulacji IFN β . W komórkach THP-1 WT obserwowana fosforylacja TYK2 zanika po 60 minutach stymulacji IFN β , podczas gdy w komórkach Pellino3 KO fosforylacja kinazy TYK2 jest znikoma (Rys. 8.9.). W przypadku czynnika transkrypcyjnego STAT1 zaobserwowano, że w komórkach typu dzikiego STAT1 wciąż jest fosforylowany po 90 minutach

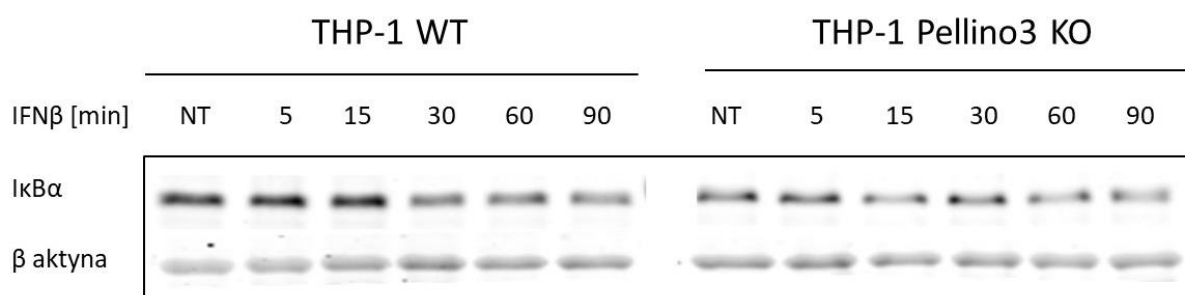
stymulowania tych komórek IFN β , podczas gdy THP-1 Pellino3 KO czynnik ten przestaje być fosforylowany po 60 minutach. Dodatkowo podobnie jak w komórkach BMDM, na membranie nitrocelulozowej nie zaobserwowano detekcji sygnału pochodzącego od kinazy JAK1, a także od czynnika transkrypcyjnego STAT2 w THP-1 traktowanych IFN β .

8.5.2. WPŁYW PELLINO3 NA AKTYWACJĘ KINAZ BIAŁKOWYCH I CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH SZLAKU SYGNAŁOWEGO PROWADZĄCEGO DO AKTYWACJI NF κ B

Kolejnym szlakiem przekazywania sygnału aktywowanym przez IFN β jest kaskada NF κ B. Aby doszło do aktywacji kanonicznej ścieżki NF κ B koniecznym etapem jest degradacja podjednostki inhibitorowej czynnika transkrypcyjnego NF κ B – I κ B α . Aby określić rolę Pellino3 w szlaku NF κ B zbadano wpływ IFN β na stopień degradacji I κ B α w komórkach BMDM i THP-1. Ponadto zbadano poziom fosforylacji kinaz IKK α , IKK β , Akt, wszystkich izoform kinaz PKC oraz poziom fosforylacji białka p65, które mogłyby być regulowane przez białko Pellino3 w szlaku sygnałowym prowadzącym do aktywacji NF κ B. Zmiany poziomu badanych białek analizowano przy użyciu techniki Western Blotting. Wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko mysiej i ludzkiej podjednostce inhibitorowej I κ B α , przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanemu białku p65 oraz przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanym formom kinaz IKK α/β , Akt i PKC. Wyniki skorelowano z całkowitą ilością badanych kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych oraz całkowitą ilością białka w komórce reprezentowaną przez ilość β aktyny w lizatach komórkowych.



Rys. 8.10. Analiza stopnia degradacji podjednostki inhibitorowej IκBα w BMDM WT i *Peli3*^{-/-} w odpowiedzi na IFNβ. BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano IFNβ o stężeniu 50 ng/ml we wskazanych punktach czasowych, wyrażonych w minutach. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Komórki lizowano na lodzie, a następnie zmierzono ilość białka w próbach przy użyciu testu BCA. Próby (zawierające 15 μg białka) oraz białkowy standard masy rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę wykorzystując elektrotransfer. Detekcję białek prowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych oraz skierowanych przeciwko nim przeciwciał sprzężonych z fluorochromem w zakresie podczerwieni, a następnie wizualizowano w aparacie Odyssey CLx. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.



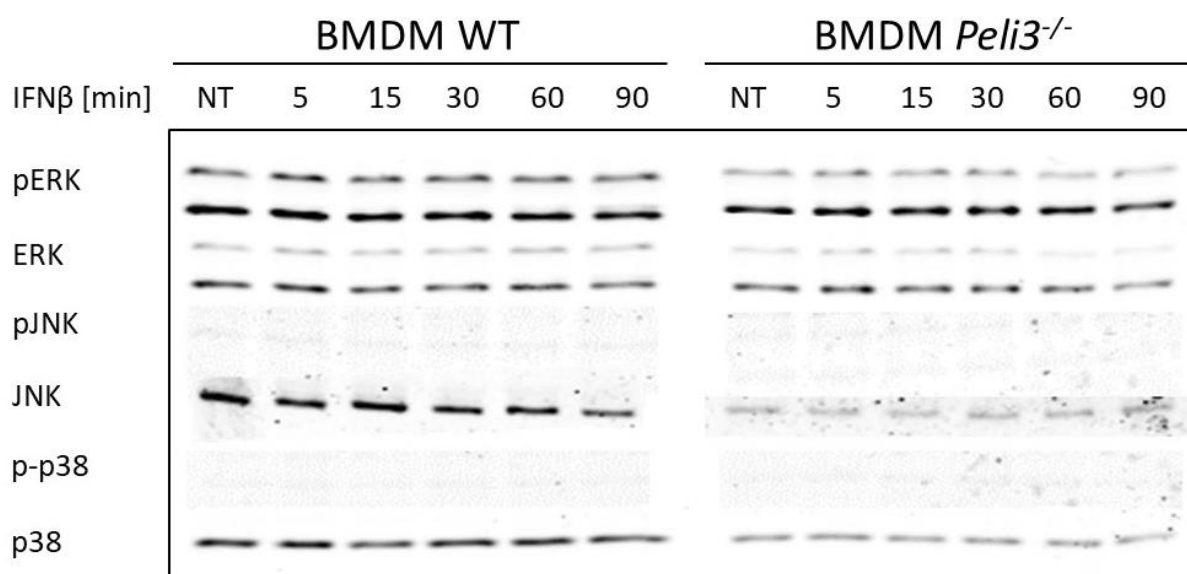
Rys. 8.11. Analiza stopnia degradacji podjednostki inhibitorowej IκBα w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFNβ. THP-1 WT i Pellino3 KO traktowano IFNβ o stężeniu 50 ng/ml we wskazanych punktach czasowych wyrażonych w minutach. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Komórki lizowano na lodzie, a następnie zmierzono ilość białka w próbach przy użyciu testu BCA. Próby (zawierające 15 μg białka) oraz białkowy standard masy rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę wykorzystując elektrotransfer. Detekcję białek prowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych oraz skierowanych przeciwko nim przeciwciał sprzężonych z fluorochromem w zakresie podczerwieni, a następnie wizualizowano w aparacie Odyssey CLx. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.

Uzyskane wyniki wykazały, że podczas stymulacji komórek BMDM oraz THP-1 IFNβ dochodzi do degradacji IκBα tylko w komórkach typu dzikiego. Podczas traktowania BMDM *Peli3*^{-/-} oraz THP-1 Pellino3 KO IFNβ poziom IκBα nie ulegał zmianie (Rys. 8.10. i Rys. 8.11.). Dodatkowo na membranie nitrocelulozowej nie

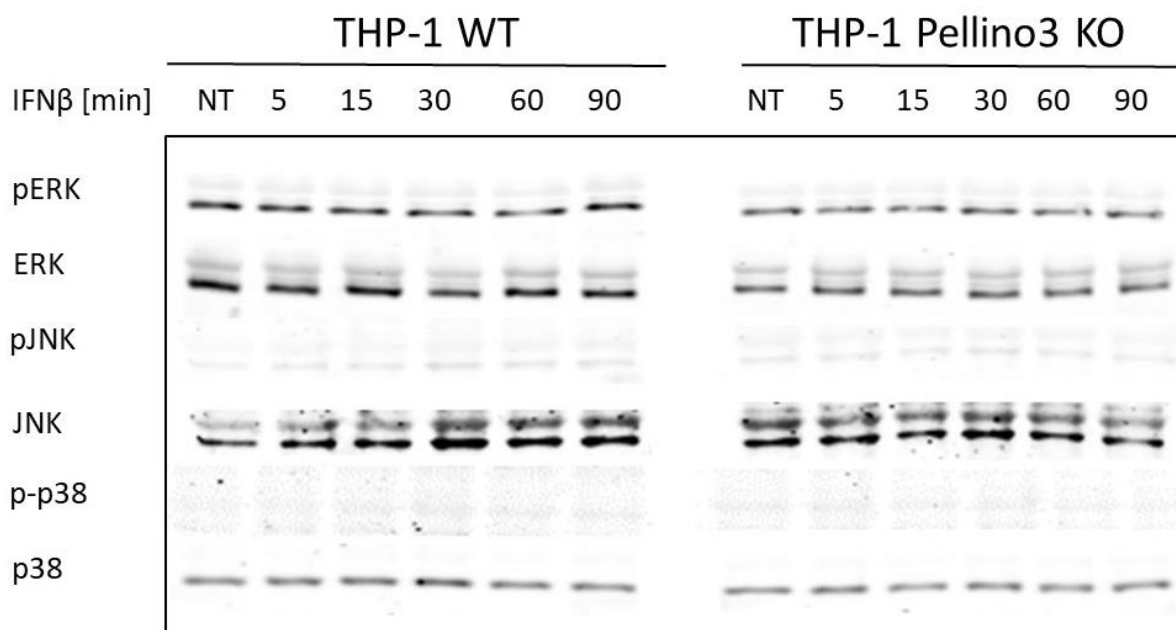
zaobserwowano detekcji sygnału pochodzącego od fosforylacji kinaz IKK α , IKK β , Akt, izoform PKC oraz białka p65, w BMDM oraz THP-1 traktowanych IFN β .

8.5.3. WPŁYW PELLINO3 NA AKTYWACJĘ KINAZ BIAŁKOWYCH MAPK

Aby ocenić udział Pellino3 w aktywacji kinaz białkowych MAPK aktywowanych w szlaku pochodzącym od IFN typu I, zbadano wpływ IFN β na aktywację i fosforylację kinaz białkowych MAPK: ERK1/2, JNK, p38 w BMDM i THP-1. Wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanym formom mysich i ludzkich kinaz białkowych: ERK1/2 (pERK), p38 (p-p38) oraz JNK (pJNK). W celu określenia zmiany poziomu fosforylacji badanych białek lizaty komórkowe poddano analizie przy użyciu techniki Western Blotting i skorelowano z całkowitą ilością kinaz ERK1/2 (ERK), p38 oraz JNK.



Rys. 8.12. Analiza aktywacji kinaz MAPK w BMDM WT i *Peli3*^{-/-} w odpowiedzi na IFN β . BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml we wskazanych punktach czasowych, wyrażonych w minutach. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Komórki lizowano na lodzie, a następnie zmierzono ilość białka w próbach przy użyciu testu BCA. Próby (zawierające 15 μ g białka) oraz białkowy standard masy rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę wykorzystując elektrotransfer. Detekcję białek prowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych oraz skierowanych przeciwko nim przeciwciał sprzężonych z fluorochromem w zakresie podczerwieni, a następnie wizualizowano w aparacie Odyssey CLx. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.



Rys. 8.13. Analiza aktywacji kinaz MAPK w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β . THP-1 WT i Pellino3 KO traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml we wskazanych punktach czasowych, wyrażonych w minutach. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Komórki lizowały na lodzie, a następnie zmierzono ilość białka w próbach przy użyciu testu BCA. Próby (zawierające 15 μ g białka) oraz białkowy standard masy rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę wykorzystując elektrotransfer. Detekcję białek prowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych oraz skierowanych przeciwko nim przeciwciał sprzężonych z fluorochromem w zakresie podczerwieni, a następnie wizualizowano w aparacie Odyssey CLx. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.

Otrzymane wyniki pokazały, że zarówno w BMDM WT i *Peli3*^{-/-} jak i w THP-1 WT i Pellino3 KO nie dochodzi do aktywacji i fosforylacji kinaz białkowych MAPK: ERK1/2, JNK, p38 (Rys. 8.12.; Rys. 8.13).

8.6. WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA TRANSLOKACJE DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH, AKTYWOWANYCH W SZLAKACH SYGNAŁOWYCH POCHODZĄCYCH OD INTERFERONU TYPU I

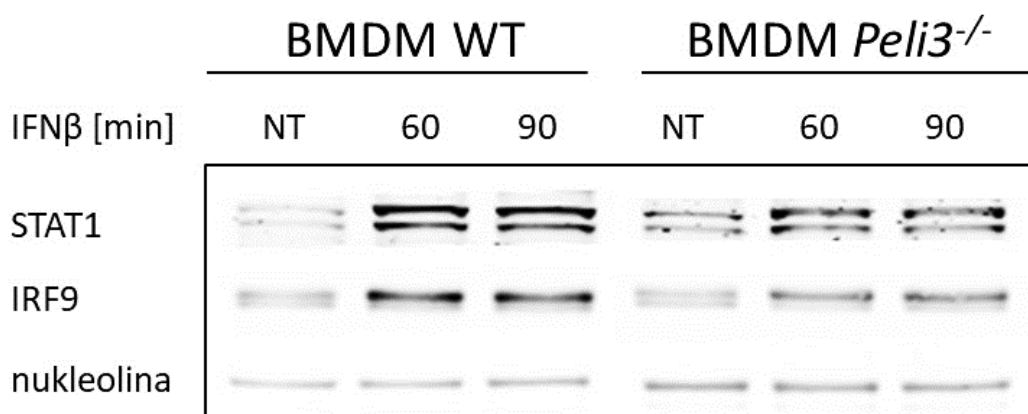
Analiza aktywacji i fosforylacji czynników transkrypcyjnych szlaku przekazywania sygnału od receptora dla IFN typu I wykazała, że Pellino3 ma wpływ na czas i na stopień fosforylacji kinazy białkowej TYK2 i czynnika transkrypcyjnego STAT1 (Rys. 8.8., Rys. 8.9). Dodatkowo analiza stopnia degradacji I κ B α pokazała, że

w komórkach z wyciszoną ekspresją genu *Peli3* (*PELI3*), nie zachodzi degradacja I κ B α , wpływając tym samym na aktywację NF κ B (Rys.8.10., Rys.8.11.).

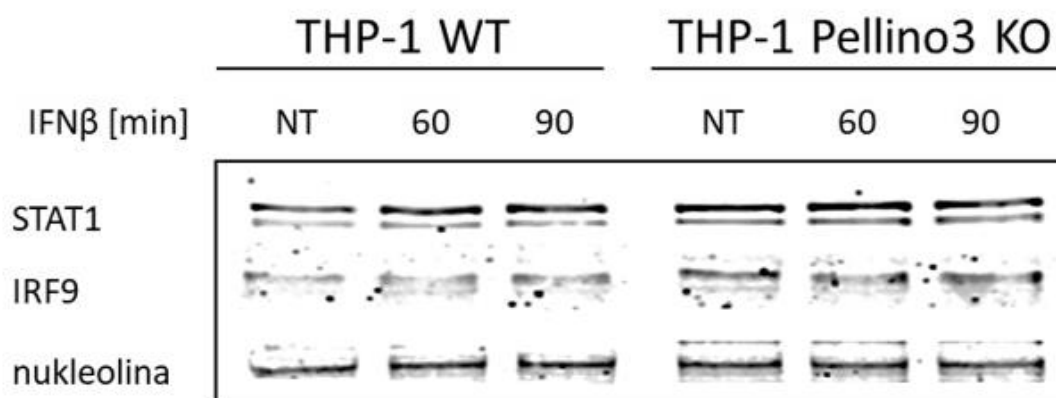
W kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić wpływ Pellino3 na translokację do jądra komórkowego czynnika transkrypcyjnego STAT1 i czynnika regulatorowego IRF9, a także białek z rodziny NF κ B: p65, c-Rel i RelB.

8.6.1. WPŁYW PELLINO3 NA TRANSLOKACJE DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH SZLAKU SYGNAŁOWEGO JAK-STAT

Stosując technikę Western blotting sprawdzono poziom całkowitej ilości STAT1 i IRF9 we frakcjach jądrowych izolowanych z komórek BMDM i THP-1. Uzyskane wyniki skorelowano z całkowitą ilością białka w jądrze komórkowym reprezentowaną przez ilość nukleoliny w lizatach z frakcji jądrowej. Wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko całkowitej ilości mysiego i ludzkiego STAT1 oraz przeciwciała skierowane przeciwko całkowitej ilości mysiego i ludzkiego IRF9.



Rys. 8.14. Analiza translokacji do jądra czynnika transkrypcyjnego STAT1 i czynnika regulatorowego IRF9 w BMDM WT i *Peli3*^{-/-} w odpowiedzi na IFN β . BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml we wskazanych punktach czasowych, wyrażonych w minutach. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Z komórek izolowano frakcje jądrowe, a następnie próby (zawierające 15 μ g białka) oraz białkowy standard masy rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę wykorzystując elektrotransfer. Detekcję białek prowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych oraz skierowanych przeciwko nim przeciwciał sprzężonych z fluorochromem w zakresie podczerwieni, a następnie wizualizowano w aparacie Odyssey CLx. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.



Rys. 8.15. Analiza translokacji do jądra czynnika transkrypcyjnego STAT1 i czynnika regulatorowego IRF9 w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β . THP-1 WT i Pellino3 KO traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml we wskazanych punktach czasowych, wyrażonych w minutach. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Z komórek izolowano frakcje jądrowe, a następnie próby (zawierające 15 μ g białka) oraz białkowy standard masy rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę wykorzystując elektrotransfer. Detekcję białek prowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych oraz skierowanych przeciwko nim przeciwciał sprzężonych z fluorochromem w zakresie podczerwieni, a następnie wizualizowano w aparacie Odyssey CLx. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.

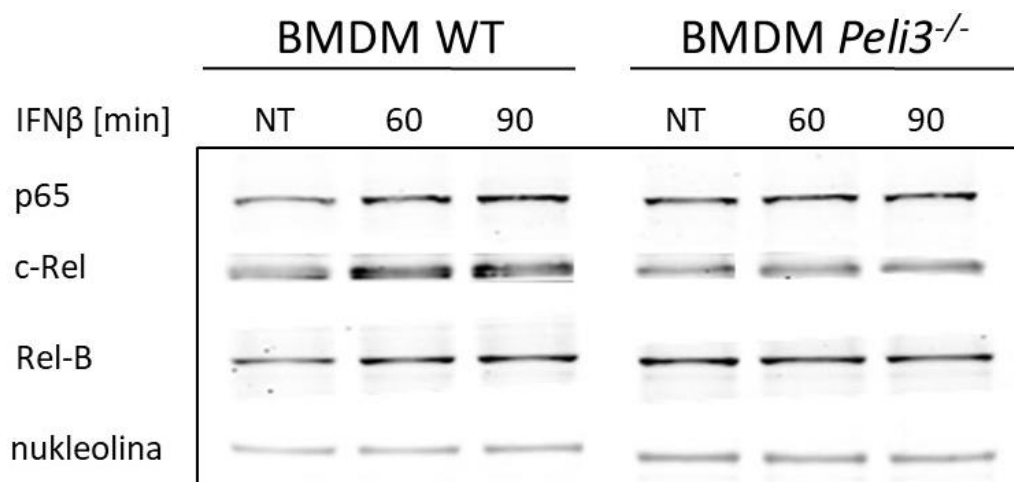
Uzyskane wyniki badań pokazały, że zarówno w komórkach BMDM WT jak i w komórkach z nokautem Pellino3 po 60 minutach stymulacji IFN β dochodzi do translokacji czynnika STAT1 do jądra komórkowego (Rys. 8.14.). Po 60 minutach traktowania komórek IFN β poziom całkowitej ilości STAT1 jest znacząco wyższy w porównaniu do komórek nietraktowanych. Jednakże poziom ten jest znacznie niższy w komórkach BMDM *Peli3*^{-/-} w porównaniu z BMDM WT.

Ponadto, zaobserwowano, że podczas traktowania BMDM IFN β zarówno w komórkach dzikich jak i w komórkach z nokautem Pellino3 dochodzi do translokacji IRF9 do jądra komórkowego (Rys. 8.14.). Wzrost poziomu całkowitej ilości IRF9 po 60 minutach traktowania komórek WT IFN β jest znacząco wyższy w porównaniu do BMDM nietraktowanych. W przypadku BMDM *Peli3*^{-/-} po 60 minutach traktowania komórek IFN β poziom całkowitej ilości IRF9 również jest wyższy w porównaniu do komórek nietraktowanych, jednakże poziom ten jest znacznie niższy w porównaniu do wyników uzyskanych w komórkach WT.

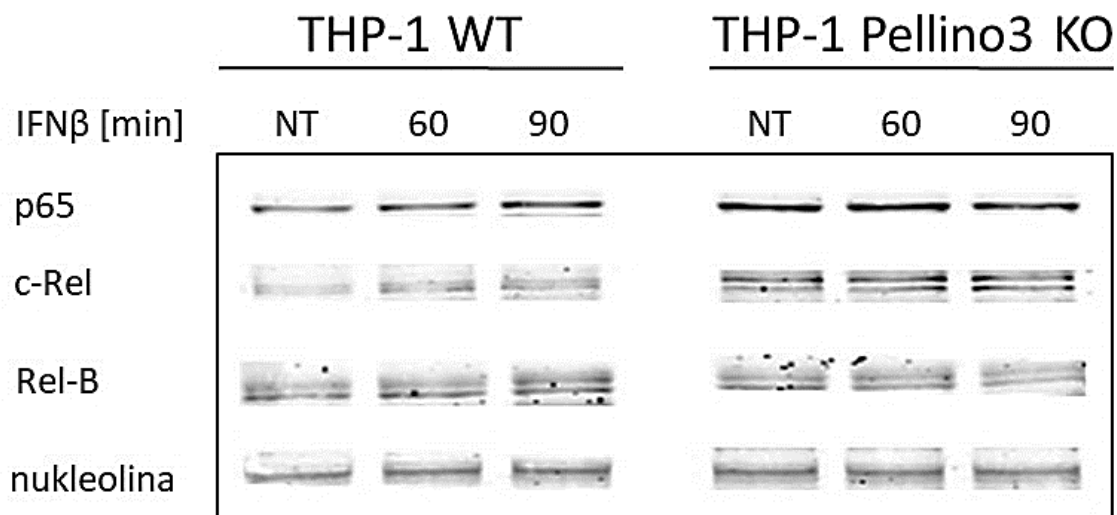
Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach THP-1 wykazały, że podczas traktowania komórek IFN β do translokacji STAT1 do jądra komórkowego dochodzi jedynie w komórkach dzikich. W THP-1 z delecją w genie kodującym Pellino3 poziom całkowitej ilości STAT1 nie zmienia się w czasie (Rys. 8.15.). Dodatkowo zaobserwowano, że podczas stymulacji THP-1 WT IFN β dochodzi do translokacji IRF9 do jądra komórkowego, podczas gdy w THP-1 Pellino3 KO translokacja ta nie jest obserwowana.

8.6.2. WPŁYW PELLINO3 NA TRANSLOKACJE DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH SZLAKU SYGNAŁOWEGO NF κ B

Stosując technikę Western blotting sprawdzono poziom całkowitej ilości białek NF κ B: p65, c-Rel oraz RelB we frakcjach jądrowych izolowanych z komórek BMDM i THP-1. Otrzymane wyniki skorelowano z całkowitą ilością białka w jądrze komórkowym reprezentowaną przez ilość nukleoliny w lizatach z frakcji jądrowej. Wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko całkowitej ilości mysiego i ludzkiego białka p65, białka c-Rel oraz białka RelB.



Rys. 8.16. Analiza translokacji do jądra komórkowego białek: p65, c-Rel oraz RelB w BMDM WT i *Peli3*^{-/-} w odpowiedzi na IFN β . BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml we wskazanych punktach czasowych, wyrażonych w minutach. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Z komórek izolowano frakcje jądrowe, a następnie próby (zawierające 15 μ g białka) oraz białkowy standard masy rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę wykorzystując elektrotransfer. Detekcję białek prowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych oraz skierowanych przeciwko nim przeciwciał sprzężonych z fluorochromem w zakresie podczerwieni, a następnie wizualizowano w aparacie Odyssey CLx. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.



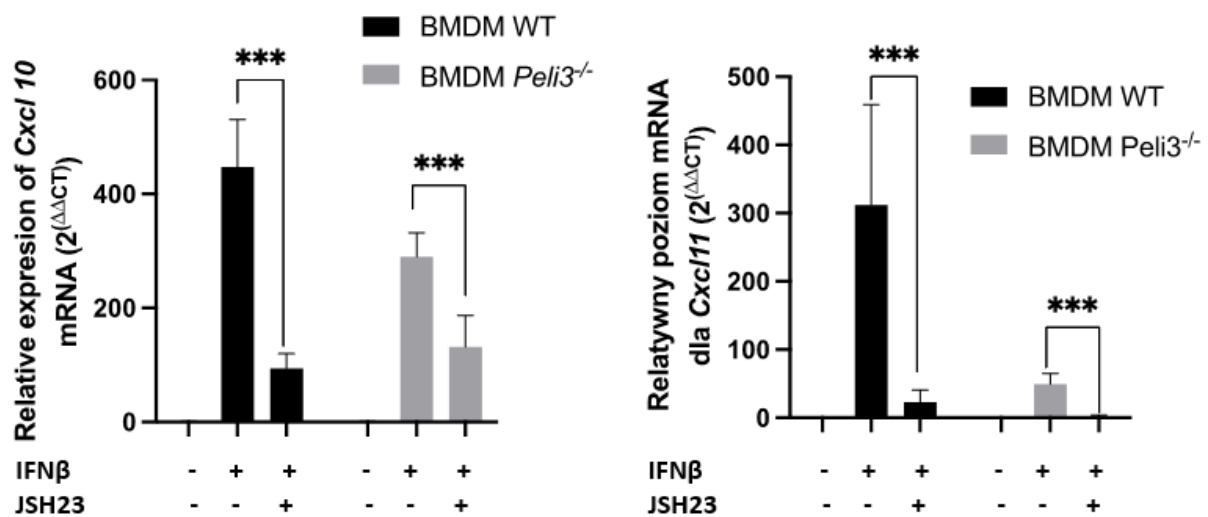
Rys. 8.17. Analiza translokacji do jądra komórkowego białek: p65, cRel oraz RelB w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β . THP-1 WT i Pellino3 KO traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml we wskazanych punktach czasowych, wyrażonych w minutach. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Z komórek izolowano frakcje jądrowe, a następnie próby (zawierające 15 μ g białka) oraz białkowy standard masy rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę wykorzystując elektrotransfer. Detekcję białek prowadzono z użyciem swoistych przeciwciał pierwszorzędowych oraz skierowanych przeciwko nim przeciwciał sprzężonych z fluorochromem w zakresie podczerwieni, a następnie wizualizowano w aparacie Odyssey CLx. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.

Uzyskane wyniki badań pokazały, że po 60 minutach traktowania komórek BMDM WT IFN β dochodzi w nich do translokacji białek z rodziny NF κ B: p65, c-Rel i RelB do jądra komórkowego (Rys. 8.16.). Uzyskane wyniki pokazały, że w komórkach BMDM WT poziom całkowitej ilości p65, c-Rel oraz RelB wzrasta wraz z czasem traktowania komórek IFN β . W przypadku BMDM *Peli3*^{-/-} całkowita ilość p65, c-Rel oraz RelB wraz z czasem traktowania komórek IFN β jest na podobnym poziomie.

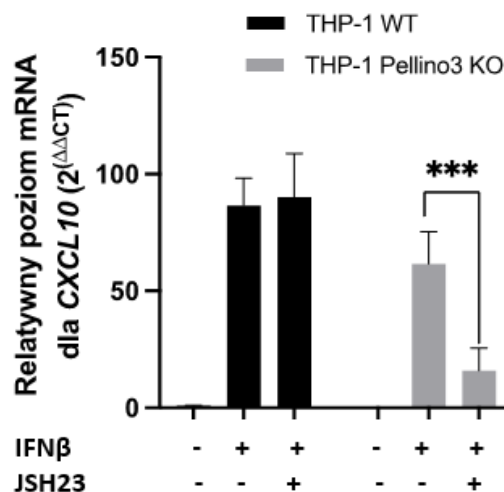
Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach THP-1 wykazały, że podczas traktowania komórek IFN β przez 60 i 90 minut jedynie w komórkach typu dzikiego dochodzi do translokacji białka p65 do jądra komórkowego (Rys. 8.17.). W THP-1 WT stymulowanych IFN β nie stwierdzono natomiast zmiany w poziomie białka cRel i RelB. W przypadku komórek THP-1 z nokautem genu kodującego Pellino3 stymulacja IFN β nie wpływa na poziom całkowitej ilości badanych białek w jądrze komórkowym.

8.7. WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA EKSPRESJE WYBRANYCH GENÓW W ODPOWIEDZI NA INTERFERON β , W OBECNOŚCI INHIBITORA NF κ B – JSH23

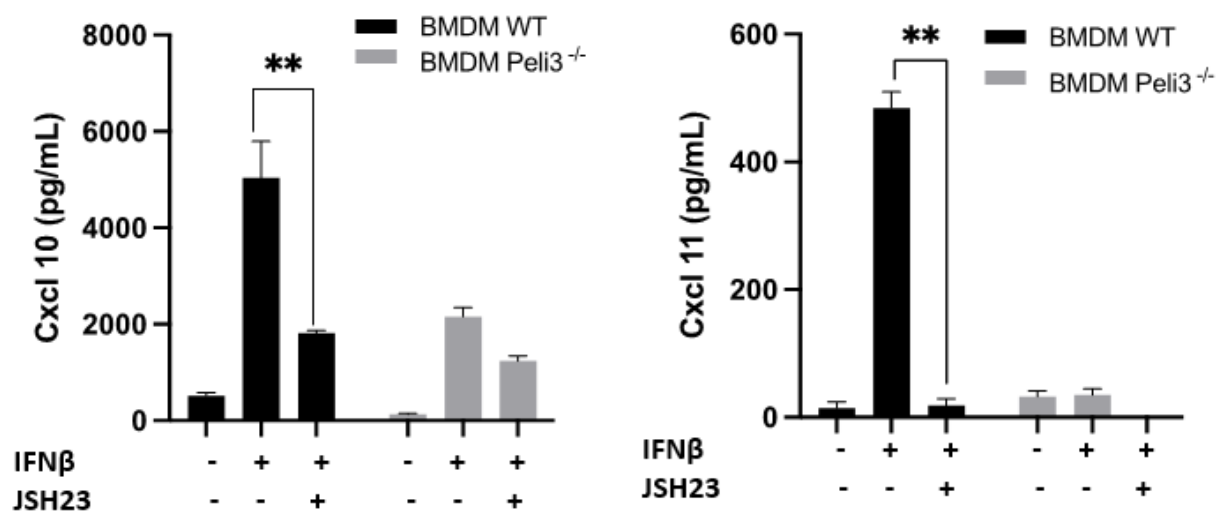
Mając na uwadze kluczową rolę NF κ B w regulacji ekspresji cytokin i chemokin podczas infekcji, w dalszym etapie badań skupiono się na zbadaniu roli tego czynnika transkrypcyjnego w regulacji ekspresji cytokin indukowanych IFN β . W tym celu komórki BMDM WT i *Peli3*^{-/-} oraz THP-1 i Pellino3 KO traktowano mysim lub ludzkim IFN β w obecności i przy braku inhibitora NF κ B – JSH23. Następnie określono zmiany poziomu ekspresji genów kodujących *Cxcl10*, *CXCL10* oraz *Cxcl11*, a także zmiany wydzielania cytokin *Cxcl10*, *CXCL10* i *Cxcl11*.



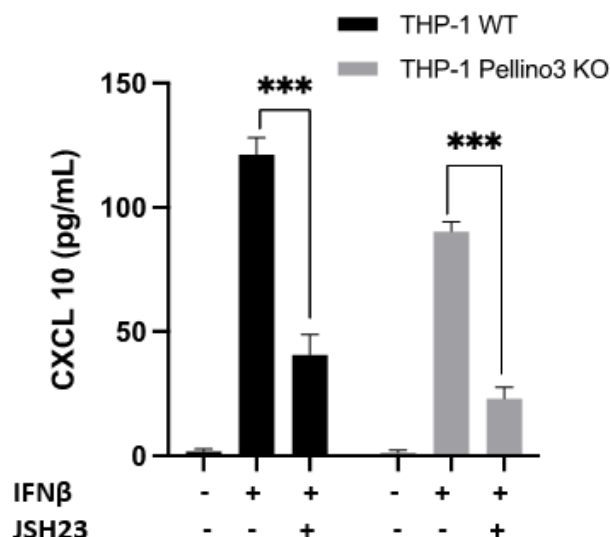
Rys. 8.18. Poziom ekspresji genów kodujących *Cxcl10*, *Cxcl11* w BMDM WT i *Peli3*^{-/-} w odpowiedzi na traktowanie komórek IFN β , w obecności JSH23. Komórki traktowano JSH23 o stężeniu 5 μ M przez 1h, a następnie IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 4h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczano relatywny poziom ekspresji genów *Cxcl10*, *Cxcl11*. Jako genu referencyjnego użyto *Hprt1*. *** p < 0,001.



Rys. 8.19. Poziom ekspresji genu kodującego CXCL10 w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na traktowanie komórek IFNβ, w obecności JSH23. Komórki traktowano JSH23 o stężeniu 5 μM przez 1h, a następnie IFNβ o stężeniu 50 ng/ml przez 4h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczano relatywny poziom ekspresji genów CXCL10. Jako genu referencyjnego użyto HPRT1. *** p<0,001.



Rys. 8.20. Poziom wydzielanych cytokin Cxcl10 i Cxcl11 w BMDM WT i Peli3^{-/-}, w odpowiedzi na IFNβ, w obecności JSH23. Komórki traktowano JSH23 o stężeniu 5 μM przez 1h, a następnie IFNβ o stężeniu 50 ng/ml przez 16h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie pobrano medium z traktowanych komórek i przeprowadzono test ELISA. ** p<0,01.



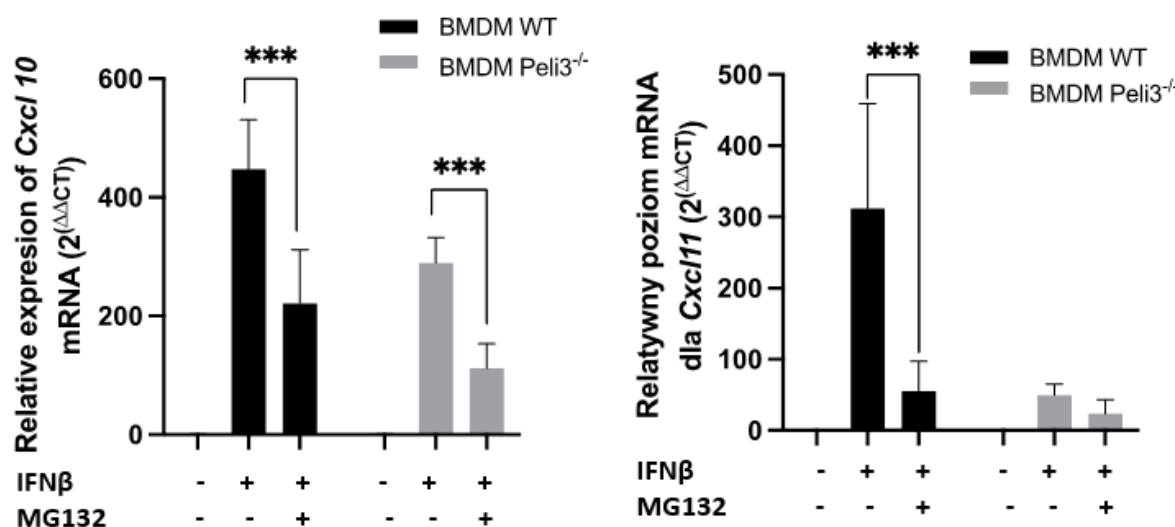
Rys. 8.21. Poziom wydzielanej cytokiny CXCL10 w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β , w obecności JSH23. Komórki traktowano JSH23 o stężeniu 5 μ M przez 1h, a następnie IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 16h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie pobrano medium z traktowanych komórek i przeprowadzono test ELISA. *** $p < 0,001$.

Analiza wyników reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że w BMDM typu dzikiego preinkubowanych z inhibitorem NF κ B – JSH23, a następnie stymulowanych IFN β obserwowano efekt hamowania ekspresji mRNA dla *Cxcl10* w porównaniu z komórkami traktowanymi samym IFN β , a ekspresja mRNA dla *Cxcl11* została zahamowana (Rys.8.18.). Podobne wyniki otrzymano w teście ELISA, gdzie w BMDM WT traktowanych JSH23 oraz IFN β obserwowano zmniejszoną produkcję cytokin *Cxcl10* i *Cxcl11*, w przeciwieństwie do komórek stymulowanych tylko IFN β (Rys.8.20.). Zarówno w BMDM jak i w THP-1 z nokautem Pellino3 zaobserwowano efekt hamowania ekspresji genów *Cxcl10*, *Cxcl11* oraz *CXCL10* w komórkach preinkubowanych z inhibitorem NF κ B, w porównaniu z komórkami traktowanymi jedynie IFN β .

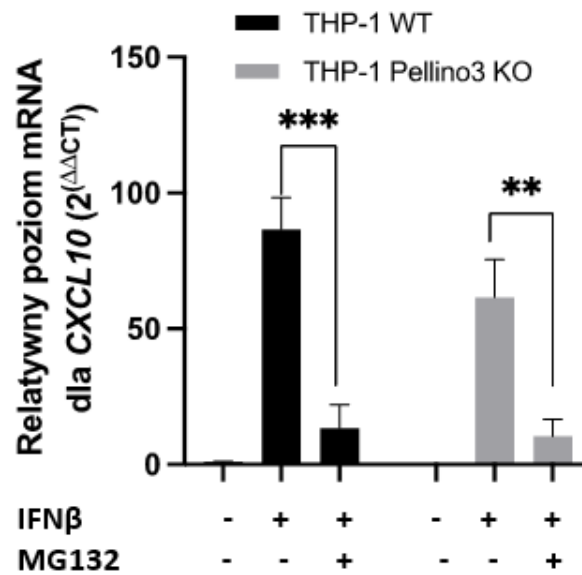
Wyniki reakcji PCR w czasie rzeczywistym pokazały, że w THP-1 WT nie zaobserwowano zahamowania ekspresji genu kodującego *CXCL10* (Rys.8.19.). Jednakże w teście ELISA obserwowano obniżenie produkcji cytokiny CXCL10 przez komórki THP-1 WT pretraktowane inhibitorem JSH23 oraz IFN β , w porównaniu do komórek traktowanych samym IFN β (Rys.8.21.).

8.8. WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA EKSPRESJĘ WYBRANYCH GENÓW W ODPOWIEDZI NA INTERFERON β , W OBECNOŚCI INHIBITORA PROTEASOMU 26S – MG132

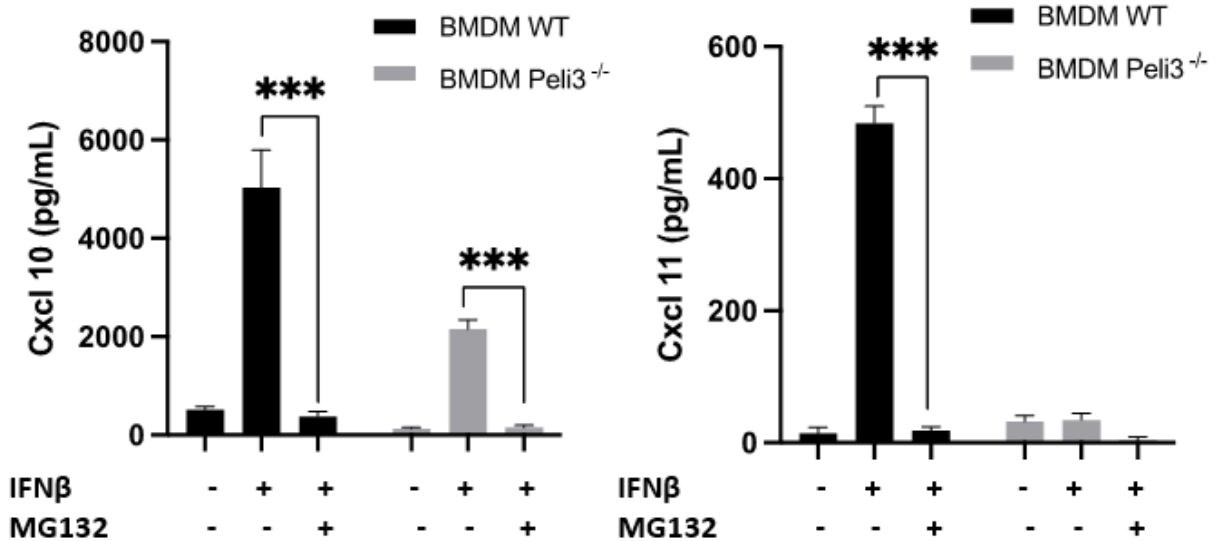
Ubikwitynacja podjednostki inhibitorowej czynnika transkrypcyjnego NF κ B – I κ B α prowadzi do degradacji I κ B α przez proteasom 26S i uwolnienia dimerów NF κ B. Uzyskane do tej pory wyniki wykazały, że zahamowanie ekspresji białka Pellino3 w komórkach BMDM i THP-1 skutkuje brakiem degradacji I κ B α oraz zahamowaniem translokacji NF κ B do jądra komórkowego. W następnym etapie badań skupiono się na określeniu roli proteasomu 26S w badanym szlaku sygnałowym aktywowanym IFN β . W tym celu komórki BMDM WT i Peli3^{-/-} oraz THP-1 i Pellino3 KO traktowano mysim lub ludzkim IFN β w obecności i przy braku inhibitora proteasomu 26S – MG132. Następnie określono zmiany poziomu ekspresji genów kodujących *Cxcl10*, *CXCL10* oraz *Cxcl11*, a także zmiany wydzielania cytokin Cxcl10, CXCL10 i Cxcl11.



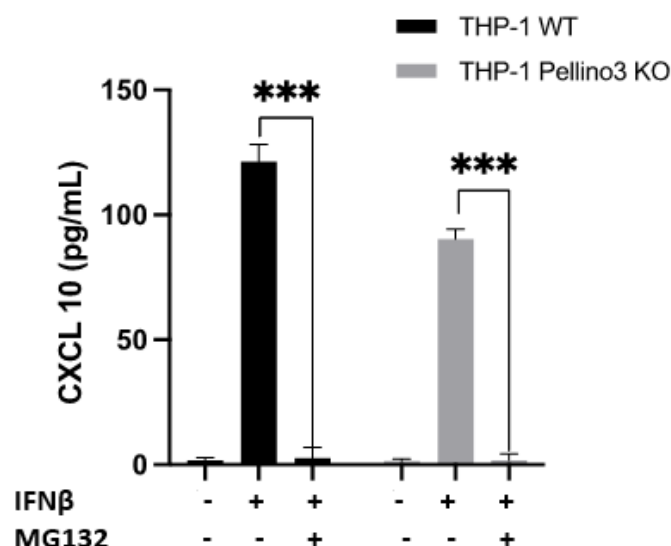
Rys. 8.22. Poziom ekspresji genów kodujących *Cxcl10*, *Cxcl11* w BMDM WT i Peli3^{-/-} w odpowiedzi na traktowanie komórek IFN β , w obecności MG132. Komórki traktowano MG132 o stężeniu 5 μ M przez 1h, a następnie IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 4h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczano relatywny poziom ekspresji genów *Cxcl10*, *Cxcl11*. Jako genu referencyjnego użyto *Hprt1*. *** p < 0,001.



Rys. 8.23. Poziom ekspresji genu kodującego *CXCL10* w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na traktowanie komórek IFN β , w obecności MG132. Komórki traktowano MG132 o stężeniu 5 μ M przez 1h, a następnie IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 4h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczano relatywny poziom ekspresji genów *CXCL10*. Jako genu referencyjnego użyto *HPRT1*. ** p<0,01; *** p<0,001.



Rys. 8.24. Poziom wydzielanych cytokin Cxcl10 i Cxcl11 w BMDM WT i *Peli3*^{-/-}, w odpowiedzi na IFN β , w obecności MG132. Komórki traktowano MG132 o stężeniu 5 μ M przez 1h, a następnie IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 16h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie pobrano medium z traktowanych komórek i przeprowadzono test ELISA. *** p<0,001.



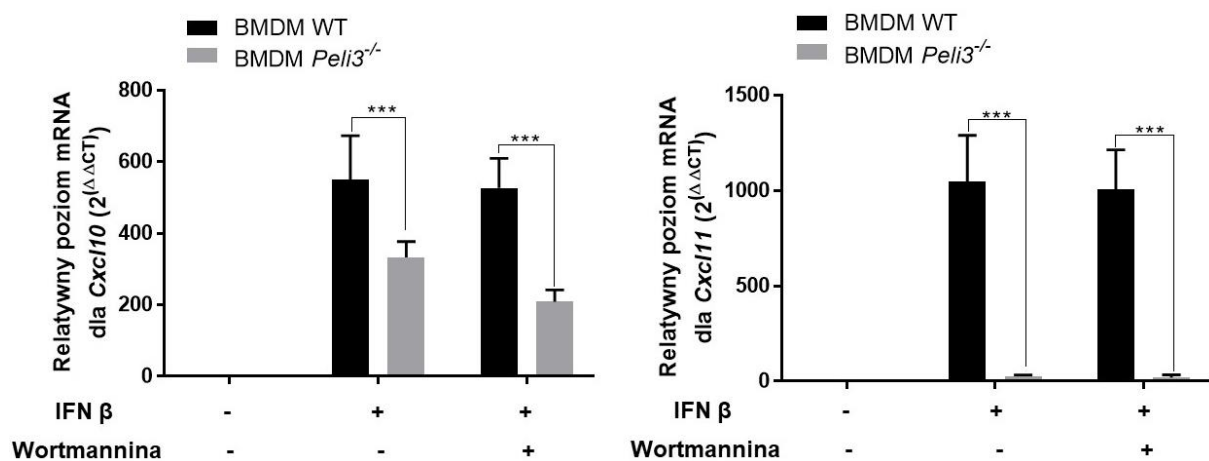
Rys. 8.25. Poziom wydzielanej cytokiny CXCL10 w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β , w obecności MG132. Komórki traktowano MG132 o stężeniu 5 μ M przez 1h, a następnie IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 16h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie pobrano medium z traktowanych komórek i przeprowadzono test ELISA. *** p<0,001.

W reakcji PCR w czasie rzeczywistym w komórkach BMDM typu dzikiego, preinkubowanych z inhibitorem proteasomu 26S – MG132, zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji mRNA dla *Cxcl10*, a produkcja mRNA dla genu *Cxcl11* została zahamowana, w porównaniu z komórkami stymulowanymi jedynie IFN β (Rys.8.22.). Podobne wyniki zaobserwowano w teście ELISA, gdzie jak pokazano na Rys.8.24., w komórkach WT traktowanych MG132 oraz IFN β doszło do zahamowania wydzielania cytokin *Cxcl10* i *Cxcl11*, w porównaniu z komórkami traktowanymi samym IFN β .

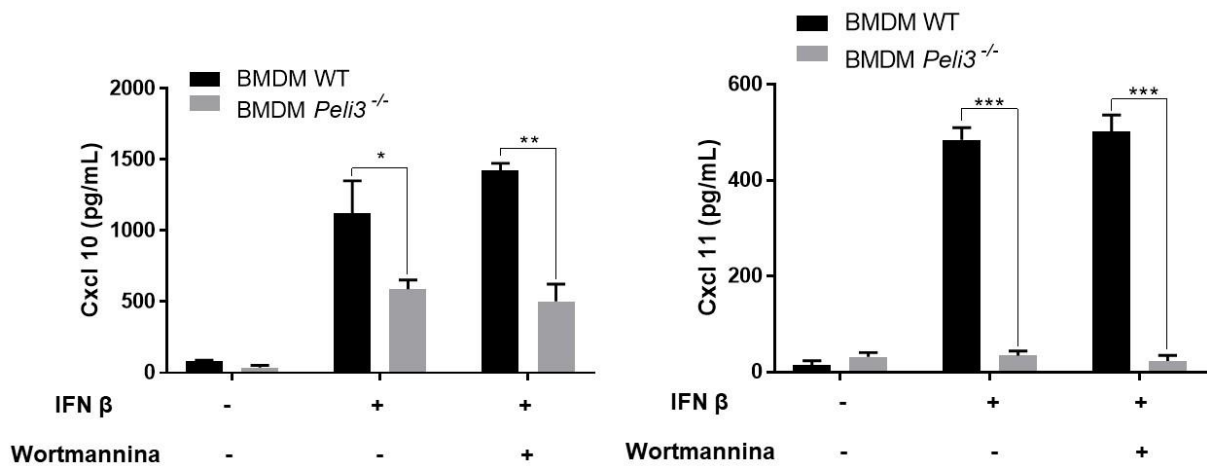
W THP-1 typu dzikiego preinkubowanych inhibitorem MG132 dochodziło do zahamowania ekspresji genu kodującego *CXCL10*, w porównaniu z komórkami traktowanymi samym IFN β (Rys.8.23.). Otrzymane wyniki reakcji PCR w czasie rzeczywistym miały swoje odzwierciedlenie w teście ELISA, w którym obserwowano zahamowanie wydzielania cytokiny *CXCL10* w komórkach pretraktowanych inhibitorem MG132, a następnie stymulowanych IFN β , w porównaniu z komórkami traktowanymi jedynie IFN β (Rys.8.25.). Dodatkowo zarówno w BMDM jak i w THP-1 z nokautem Pellino3 preinkubowanych z inhibitorem NF κ B, zaobserwowano efekt hamowania ekspresji genów *Cxcl10*, *Cxcl11* i *CXCL10* oraz hamowana została produkcja cytokin kodowanych przez te geny, w porównaniu z komórkami traktowanymi jedynie IFN β .

8.9. WPŁYW BIAŁKA PELLINO3 NA EKSPRESJE WYBRANYCH GENÓW W ODPOWIEDZI NA INTERFERON β , W OBECNOŚCI INHIBITORA PI3K – WORTMANNINY ORAZ W OBECNOŚCI INHIBITORA KINAZY BIAŁKOWEJ C – Ro318220

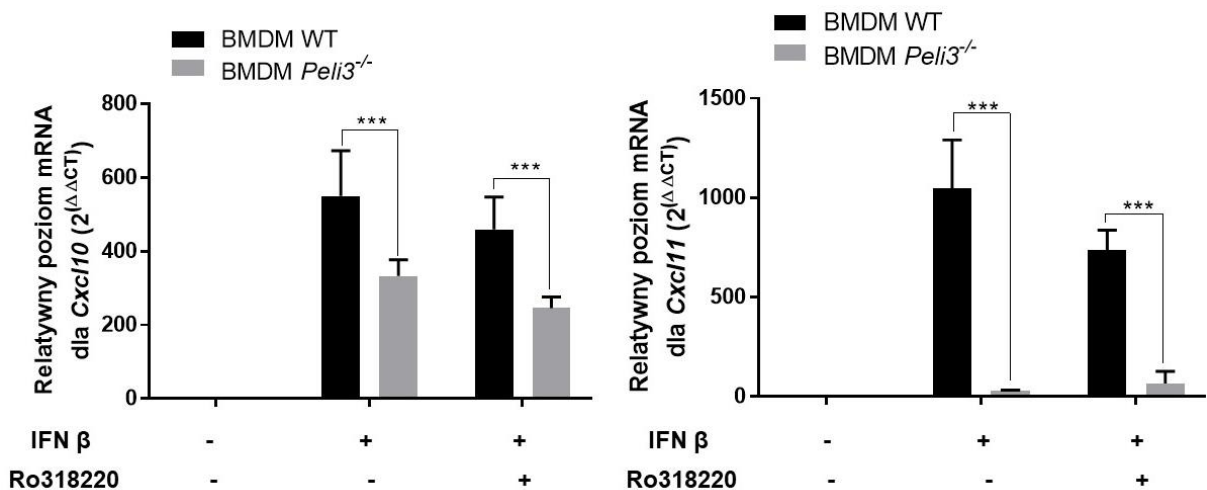
Aktywacja NF κ B może zachodzić przy aktywacji kinazy białkowej PI3K, prowadzącej do fosforylacji kinazy białkowej Akt. Konsekwencją fosforylacji kinazy białkowej Akt może być aktywacja i fosforylacja kinazy białkowej C (PKC). W kolejnym etapie badań skupiono się na określeniu roli kinazy PI3K oraz PKC w badanym szlaku sygnałowym. W tym celu komórki BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano IFN β w obecności i przy braku inhibitora kinazy PI3K – Wortmanniny, a także w obecności i przy braku inhibitora PKC – Ro318220. Następnie określono zmiany poziomu ekspresji genów kodujących *Cxcl10* oraz *Cxcl11*, a także zmiany wydzielania cytokin Cxcl10 i Cxcl11.



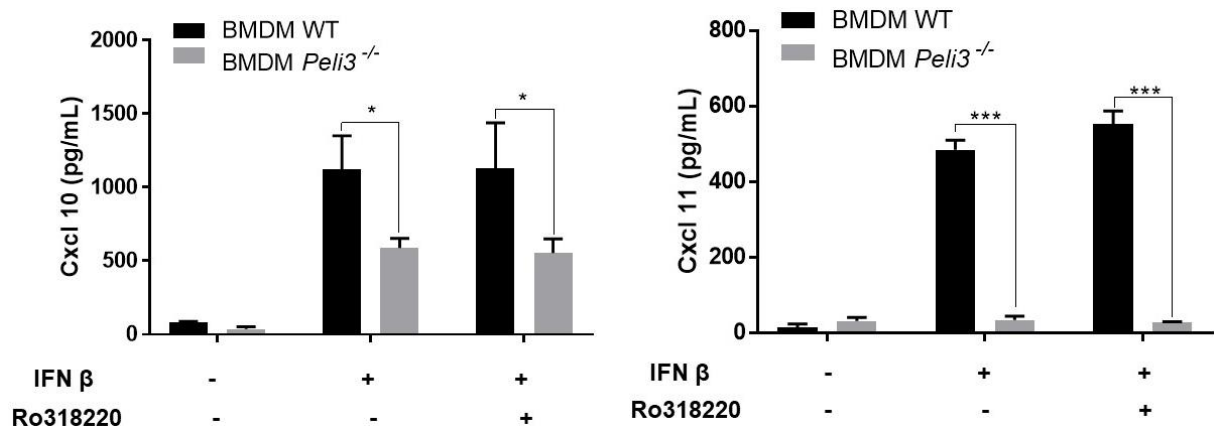
Rys. 8.26. Poziom ekspresji genów kodujących *Cxcl10* oraz *Cxcl11* w BMDM WT i *Peli3*^{-/-} w odpowiedzi na traktowanie komórek IFN β , w obecności wortmanniny. Komórki traktowano wortmanniną o stężeniu 0,5 μ M przez 1h, a następnie IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 4h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisano na cDNA i metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczano relatywny poziom ekspresji genów *Cxcl10*, *Cxcl11*. Jako genu referencyjnego użyto *Hprt1*. *** p<0,001.



Rys. 8.27. Poziom wydzielanych cytokin Cxcl10 i Cxcl11 w BMDM WT i *Peli3*^{-/-}, w odpowiedzi na IFNβ, w obecności wortmanniny. Komórki traktowano wortmanniną o stężeniu 0,5 μM przez 1h, a następnie IFNβ o stężeniu 50 ng/ml przez 16h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie pobrano medium z traktowanych komórek i przeprowadzono test ELISA. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.



Rys. 8.28. Poziom ekspresji genów kodujących *Cxcl10*, *Cxcl11* w BMDM WT i *Peli3*^{-/-} w odpowiedzi na traktowanie komórek IFNβ, w obecności Ro318220. Komórki traktowano Ro318220 o stężeniu 1 μM przez 1h, a następnie IFNβ o stężeniu 50 ng/ml przez 4h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczano relatywny poziom ekspresji genów *Cxcl10*, *Cxcl11*. Jako genu referencyjnego użyto *Hprt1*. *** p<0,001.



Rys. 8.29. Poziom wydzielanych cytokin Cxcl10 i Cxcl11 w BMDM WT i *Peli3*^{-/-}, w odpowiedzi na IFNβ, w obecności Ro318220. Komórki traktowano Ro318220 o stężeniu 1 μM przez 1h, a następnie IFNβ o stężeniu 50 ng/ml przez 16h. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT). Następnie pobrano medium z traktowanych komórek i przeprowadzono test ELISA. * p<0,01; *** p<0,001.

Analiza wyników wykazała, że dodatek wortmanniny, a także obecność Ro318220 nie wpływa na poziom ekspresji genów *Cxcl10* i *Cxcl11* oraz na wydzielanie cytokin Cxcl10 i Cxcl11 zarówno w komórkach BMDM WT i *Peli3*^{-/-}, jak i w komórkach THP-1 WT i Pellino3 KO.

9. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

- 1) Ligaza ubikwityny Pellino3 jest zaangażowana w szlak sygnalizacyjny od receptora dla IFN typu I i reguluje produkcję zależnych od receptora cytokin.
- 2) Nokaut genu *Peli3* (*PELI3*) nie wpływa na poziom ekspresji podjednostek receptora dla IFN I, a zaobserwowane zaburzenia w wydzielaniu cytokin wynikają z deregulacji szlaków sygnałowych.
- 3) W szlaku sygnałowym aktywowanym przez IFN β , ligaza Pellino3 nie jest zaangażowana w aktywację i fosforylację kinaz białkowych MAPK: ERK1/2, JNK, p38
- 4) W szlaku przekazywania sygnału aktywowanym przez IFN β , kinazy PI3K oraz PKC nie ulegają aktywacji.
- 5) W kaskadzie przekazywania sygnału indukowanej przez IFN β , białko Pellino3 bierze udział w aktywacji i fosforylacji czynnika transkrypcyjnego STAT1, wpływa również na degradację podjednostki inhibitorowej czynnika transkrypcyjnego NF κ B – I κ B α
- 6) Pellino3 bierze udział w regulacji kaskady sygnalizacyjnej IFN β /IFNAR/NF κ B w BMDM i THP-1.

10. DYSKUSJA

Odkrycie IFN i chęć zrozumienia molekularnych mechanizmów jakie pełni on w organizmach było głównym postępowaniem w biologii i medycynie w ciągu ostatnich 60 lat [Borden i wsp. 2007]. W tym czasie poznano strukturę wielu IFN, scharakteryzowano geny kodujące te cytokiny [Rubinstein i wsp. 1979; Trent i wsp. 1982; Bach i wsp. 1997; Kotenko i wsp. 2003], a także opisano procesy zachodzące w szlakach przekazywania sygnału [Darnell i wsp. 1994; Uddin i wsp. 1999; Bach i wsp. 1997; Kotenko i wsp. 2003]. IFN typu I aktywowane są podczas infekcji bakteryjnej lub wirusowej, której towarzyszy wiązanie się liganda pochodzącego z patogenu do receptorów takich jak receptory RIG-I-podobne (RLR) lub receptory Toll-podobnymi (TLR) [Thompson i wsp. 2011]. Następnie uruchamiana jest kaskada przekazywania sygnału prowadząca do wytworzenia IFN typu I [Park i wsp. 2021]. Wydzielanie tego białka na skutek infekcji prowadzi do aktywacji receptora IFNAR, a w konsekwencji do uruchomienia kaskady sygnalizacyjnej IFN I [Zanin i wsp. 2021]. Poszerzenie wiedzy na temat immunomodulacyjnej funkcji IFN I oraz ich przeciwwirusowego działania pozwoliło na wykorzystanie tych cytokin jako leków przeciwwirusowych [Friedman i Contente, 2010; Utay i Douek, 2016], w terapiach nowotworowych [Goldstein i Laszlo, 1988] oraz w terapiach schorzeń związanych z zaburzeniami odpornościowymi [Filipi i Jack, 2020]. Kliniczne zastosowanie IFN spowodowało, że zyskuje on coraz większe zainteresowanie badaczy. Każdego roku publikowanych jest nawet kilka tysięcy artykułów naukowych dotyczących IFN, co wizualizuje jak ważne jest dla naukowców prowadzenie badań nad tymi białkami.

Ligaza ubikwityny Pellino3 zaangażowana jest w regulację szlaków sygnałowych wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. W zależności od receptora i czynnika, który wiąże się z nim, białko Pellino3 może wpływać na wydzielanie IFN typu I. W ścieżce sygnałowej aktywowanej przez TLR3 Pellino3 oddziałuje z TRAF6, a w konsekwencji ligaza ta hamuje indukcję czynnika IRF7, co prowadzi do zahamowania ekspresji IFN β [Siednienko i wsp. 2012]. Dodatkowo, Pellino3 może regulować szlaki sygnałowe aktywowane przez receptor TLR4. Pobudzenie szlaku sygnalizacyjnego przez utlenioną formę lipoproteiny niskiej gęstości (oxLDL) powoduje zależną od IRAK1/4 aktywację Pellino3, który monoubikwitynuje białko TANK i uniemożliwia stworzenie kompleksu TANK/TBK1 z TRAF3, w odpowiedzi na aktywację receptora

TLR4. W konsekwencji obserwuje się osłabienie ekspresji IFN β w odpowiedzi na LPS [Tzieply i wsp. 2012].

Zważywszy, że opisano udział ligazy ubikwityny Pellino3 w regulacji produkcji IFN β , zadaliśmy sobie pytanie czy Pellino3 może również wpływać na szlaki sygnałowe aktywowane w wyniku związania się INF β z receptorem IFNAR.

Badania rozpoczęto od wybrania modelu badawczego, mysich makrofagów pochodzenia szpikowego oraz ludzkich monocytów, które zostały wykorzystane do dalszych badań. Analiza danych literaturowych wykazała, że IFN β promuje ścieżki sygnałowe prowadzące do wydzielania cytokin należących do rodziny chemokin CXC: CXCL10 [Qian i wsp., 2007] i CXCL11 [Rani i wsp., 1996]. Chemokina CXCL9, również należąca do rodziny CXC, nie jest indukowana przez IFN β , lecz przez IFN γ [Farber i wsp., 1997]. Bazując na danych literaturowych wstępnie wytypowano stężenia IFN β pozwalające na aktywację cytokin w badanych komórkach. Wybrano następujące stężenia interferonu: 5, 10, 50, 100 ng/ml [Iglesias i wsp., 2018; Sheikh i wsp., 2014; Satyanarayanan i wsp., 2019; Hirsch i wsp., 2009]. Analiza profilu ekspresji cytokin wykazała, że 50 ng/ml jest optymalnym stężeniem pobudzającym BMDM do ekspresji cytokin (Rys.8.1.). Poziom mRNA dla *Cxcl10* i *Cxcl11* w komórkach traktowanych IFN β o stężeniu 100 ng/ml był nieznacznie wyższy od poziomu ekspresji cytokin w komórkach stymulowanych IFN β o stężeniu 50 ng/ml. Dodatkowo wykazano, że wzrost poziomu mRNA dla genów *Cxcl10* i *Cxcl11* zależy od czasu stymulacji IFN β . Komórki BMDM traktowano IFN β o stężeniu 50 ng/ml przez 1, 2, 3, 4h (Rys.8.2.). Wyniki wskazały, że spośród wytypowanych punktów czasowych, stymulacja komórek przez 4h skutkuje dwu-krotnie wyższym poziomem mRNA dla badanych cytokin, w stosunku do punktu czasowego 3h, dlatego do dalszych badań wytypowano punkt czasowy 4h. Ponadto potwierdzono, że IFN β nie indukuje ekspresji genu *Cxcl9* w komórkach BMDM, co jest tożsame z danymi literaturowymi [Farber i wsp., 1997].

Pierwszym etapem pracy było ustalenie udziału białka Pellino3 w ścieżce sygnałowej zależnej od pobudzenia receptora IFNAR. Badania te miały na celu ustalenie czy brak białka Pellino3 w BMDM i THP-1 wpływa na poziom ekspresji genów *Cxcl10* i *CXCL10* oraz *Cxcl11* i *CXCL11*, kodujących odpowiednio białka *Cxcl10* i *CXCL10* oraz *Cxcl11* i *CXCL11*, po stymulacji komórek IFN β . Analiza wyników PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że nokaut genów *Peli3* i *PELI3* skutkuje zmniejszeniem produkcji mRNA dla *Cxcl10* i *CXCL10* oraz *Cxcl11*, a także brakiem zmian w przypadku produkcji mRNA dla *Cxcl9*, *CXCL9* i *CXCL11* (Rys.8.3., Rys. 8.4). Wyniki

te potwierdzają pozytywne zaangażowanie białka Pellino3 w proces aktywacji ekspresji ISG, do których należą geny kodujące badane chemokiny. Równocześnie doniesienia literaturowe wskazywały, że ligaza ubikwityny Pellino3 może pełnić również rolę negatywnego regulatora ekspresji genu *Cxcl10* w ścieżce sygnałowej zależnej od receptora TLR3 aktywowanej syntetycznym ligandem Poly(I:C) i wirusem EMCV [Siednienko i wsp. 2012]. Obserwowane rozbieżności sugerują, że białko Pellino3 pełni funkcję immunomodulatora i w zależności od receptora aktywującego sygnał, może pozytywnie lub negatywnie regulować ekspresję genu *Cxcl10* i *CXCL10*.

W następnym etapie badań, korzystając z techniki ELISA, określono ilość produkowanych cytokin *Cxcl10* i *Cxcl11* w BMDM oraz *CXCL10* i *CXCL11* w THP-1. Uzyskane wyniki były tożsame z wcześniejszą analizą poziomu mRNA dla tych chemokin. Wykazano, że po stymulacji IFN β poziom *Cxcl10* oraz *CXCL10* w BMDM *Peli3*^{-/-} oraz w THP-1 Pellino3 KO jest obniżony w stosunku do komórek WT (Rys.8.5., Rys.8.6.), zaś w komórkach z nokautem *Peli3* zaobserwowano prawie całkowite zahamowanie produkcji *Cxcl11*, w porównaniu do BMDM WT. Obserwowane wyniki sugerują, że ligaza ubikwityny Pellino3 pełni funkcję pozytywnego regulatora wydzielania cytokin: *Cxcl10/CXCL10* oraz *Cxcl11*. Otrzymane wyniki korespondują z danymi literaturowymi opisującymi Pellino3 jako pozytywnego regulatora produkcji białka *Cxcl10* w szlaku sygnalizacyjnym zależnym od RIG-I, indukowanym wirusem VSV [Reniewicz i wsp. 2021].

W kolejnym etapie pracy, ustalono czy nokaut *Peli3* w BMDM i *PELI3* i w THP-1 wpływa na poziom ekspresji genów *lfnar1*, *lfnar2*, *IFNAR1* i *IFNAR2*, kodujących odpowiednio mysie i ludzkie podjednostki receptora dla IFN typu I. Wykazano, że brak białka Pellino3 nie wpływa na poziom ekspresji podjednostek IFNAR (Rys. 8.7.). Obserwacja ta sugeruje, że różnice w ilości mRNA dla cytokin, pomiędzy komórkami typu dzikiego, a z nokautem białka Pellino3 nie są związane z wpływem Pellino3 na ekspresję receptora IFNAR.

Aktywacja receptora dla IFN I najczęściej prowadzi do indukcji kaskady sygnałowej JAK-STAT, a w rezultacie do aktywacji i fosforylacji czynników transkrypcyjnych oraz ekspresji ISG. Jak do tej pory brak jest doniesień literaturowych dotyczących roli ligazy Pellino3 w regulacji białek w szlaku sygnałowym JAK-STAT. W związku z tym, że ligaza ubikwityny Pellino3 jest pozytywnym regulatorem produkcji białek *Cxcl10* i *Cxcl11* oraz transkrypcji ich genów, postanowiono zbadać poziom fosforylacji wybranych kinaz i czynników transkrypcyjnych aktywowanych w kaskadach

sygnałowych zależnych od IFN typu I, wykorzystując technikę Western blotting. Otrzymane wyniki pokazały, że już po 5 minutach traktowania BMDM WT IFN β badany czynnik transkrypcyjny STAT1 ulega fosforylacji. Po 30 minutach fosforylacja STAT1 osiąga maksymalną wartość, a następnie zaczyna spadać i po 90 minutach od dodania IFN β osiąga wartość podobną jak w 5 minucie stymulacji WT. W przypadku komórek z delacją genu *Peli3* poziom fosforylacji czynnika transkrypcyjnego STAT1 jest niski w 5 minucie traktowania komórek, a po 30 minutach zaczyna spadać do zera (Rys.8.8.). Przedstawione wyniki sugerują, że fosforylacja czynnika transkrypcyjnego STAT1 w komórkach BMDM jest zależna od obecności ligazy ubikwityny i przy jej braku nie obserwuje się fosforylacji STAT1. Badania przeprowadzone na THP-1 wykazały, że w komórkach WT czynnik transkrypcyjny STAT1 jest fosforylowany w badanych punktach czasowych. Zaś w THP-1 *Pellino3* KO czynnik transkrypcyjny STAT1 ulega fosforylacji w 5 minucie, a fosforylacja STAT1 zanika po 60 minutach stymulacji komórek IFN β . W przypadku badanej kinazy TYK2 w THP-1 wykazano, że w komórkach WT po 5 minutach i 15 minutach od dodania IFN β kinaza TYK2 ulega fosforylacji, w porównaniu do komórek *Pellino3* KO gdzie TYK2 praktycznie nie ulega fosforylacji. (Rys.8.9).

Z uwagi na unikatowość tych obserwacji postanowiono zbadać jaki wpływ ma ligaza ubikwityny *Pellino3* na translokację do jądra komórkowego czynników transkrypcyjnych STAT1 i IRF9, w tym celu wykorzystano technikę Western Blotting. Otrzymane wyniki wykazały, że translokacja do jądra komórkowego STAT1 i IRF9 w BMDM zachodzi zarówno w komórkach WT jak i w komórkach z delacją genu *Peli3*. Jednakże, w komórkach *Peli3*^{-/-} proces ten zachodzi z mniejszą wydajnością (Rys.8.14.). W komórkach THP-1 pokazano, że translokacja czynnika transkrypcyjnego STAT1 zachodzi jedynie w komórkach typu dzikiego, a w THP-1 *Pellino3* KO translokacja do jądra komórkowego STAT1 nie zachodzi. Podobnie jak w przypadku czynnika transkrypcyjnego STAT1, translokacja do jądra komórkowego czynnika IRF9 zachodzi tylko w komórkach WT, zaś w komórkach z nokautem genu *PELI3* czynnik ten nie jest translokowany do jądra (Rys.8.15.).

Modyfikacje potranslacyjne takie jak fosforylacja i ubikwitynacja pełnią kluczową rolę w regulacji przekazywania sygnału indukowanego przez IFN typu I. Fosforylacja kinaz JAK1, TYK2, STAT1 oraz STAT2 jest pierwszym etapem szlaku, który napędza aktywację kanonicznej sygnalizacji IFN I i prowadzi do ekspresji ISG. Związanie się IFN typu I do receptora skutkuje aktywacją kinazy TYK2 przez podjednostkę receptora

IFNAR1 oraz kinazy JAK1 przez IFNAR2, czego następstwem jest fosforylacja tyrozyny 701 w STAT1 przez JAK1. Otrzymane wyniki badań wskazują, że w komórkach THP-1 aktywacja czynnika transkrypcyjnego STAT1 oraz kinazy TYK2 są regulowane przez ligazę Pellino3. W komórkach z nokautem genu dla tej ligazy proces fosforylacji TYK2 praktycznie nie zachodzi, co objawia się niskim poziomem fosforylacji STAT1, a w konsekwencji zmniejszoną translokacją czynnika STAT1 oraz IRF9 do jądra komórkowego w komórkach Pellino3 KO. Niższy poziom czynników STAT1 oraz IRF9 w jądrze komórkowym powoduje zmniejszoną ekspresję genów kodujących *Cxcl10* i *CXCL10* oraz zmniejszonym wydzielaniem cytokin Cxcl10 oraz CXCL10.

Innym szlakiem sygnałowym, który może zostać indukowany przez IFN β , jest kaskada sygnalizacyjna prowadząca do aktywacji kinaz MAPK. Wcześniejsze doniesienia literaturowe dotyczące białka Pellino3 wskazują, że ligaza ta jest powiązana z regulacją aktywacji kinaz z rodziny MAPK, p38 i JNK, zależnych od aktywacji receptora dla IL-1 [Jensen i wsp. 2003]. Ostatnie doniesienia literaturowe wykazały, że Pellino3 w szlaku sygnałowym zależnym od cytozolowych receptorów RIG-I, moduluje aktywność kinaz ERK1/2, które również należą do rodziny kinaz MAPK [Reniewicz i wsp. 2021]. Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe postanowiono zbadać rolę ligazy ubikwityny Pellino3 w aktywacji i fosforylacji kinaz MAPK: p38, JNK oraz ERK1/2.

Otrzymane wyniki pokazały, że kinazy p38, JNK i ERK1/2 nie biorą udziału w badanym szlaku, gdyż nie są fosforylowane zarówno w BMDM i THP-1 typu dzikiego, jak i w komórkach nokautem genu dla białka Pellino3 (Rys.8.12., Rys.8.13).

Kolejnym szlakiem sygnałowym aktywowanym poprzez interakcje receptora IFNAR z IFN β jest kaskada aktywująca czynnik transkrypcyjny NF κ B. W cytoplazmie komórki znajduje się nieaktywna forma NF κ B, która tworzy kompleks (trimer) z białkiem inhibitorowym z rodziny I κ B, najczęściej I κ B α . Oddziaływanie IFN β z receptorem dla IFN typ I indukuje fosforylację I κ B α przez kinazy IKK, a następnie białko inhibitorowe ulega proteosomalnej degradacji przez proteasom 26S. Uwolniony dimer NF κ B z odsłoniętą sekwencją sygnałową NLS (sygnał lokalizacji jądrowej) jest translokowany do jądra komórkowego. Mając na uwadze doniesienia literaturowe potwierdzające, że ligaza ubikwityny Pellino3 jest zaangażowana w regulację aktywacji NF κ B, zależnej od IL-1 [Xiao i wsp. 2008], postanowiono zbadać wpływ białka Pellino3 na aktywację NF κ B przez IFN β . Wykorzystując technikę Western blotting zmierzono

poziom degradacji podjednostki inhibitorowej czynnika transkrypcyjnego NF κ B – I κ B α po stymulacji komórek BMDM i THP-1 interferonem β . Otrzymane wyniki pokazały, że zarówno w komórkach BMDM WT jak i THP-1 WT podjednostka I κ B α ulega degradacji (Rys.8.10., Rys.8.11.). Jednakże zarówno w BMDM, jak i THP-1 z nokautem białka Pellino3 nie zachodzi degradacja podjednostki I κ B α . Wyniki te wskazują, że degradacja I κ B α jest zależna od obecności białka Pellino3.

Biorąc pod uwagę obserwację, że nokaut genu *Peli3* w BMDM i genu *PELI3* w THP-1 skutkuje brakiem degradacji I κ B α , postanowiono określić wpływ Pellino3 na translokację do jądra komórkowego wybranych podjednostek NF κ B. Wykorzystując technikę Western blotting, zbadano translokację do jądra komórkowego p65 (RelA), RelB oraz cRel. Otrzymane wyniki wykazały, że w BMDM translokacja do jądra komórkowego wszystkich tych białek zachodzi w komórkach WT, a w komórkach z delacją genu *Peli3* translokacja do jądra komórkowego p65, RelB oraz cRel nie zachodzi (Rys.8.16.). W THP-1 WT jedynie białko p65 ulega translokacji do jądra komórkowego, natomiast w komórkach Pellino3 KO proces translokacji do jądra komórkowego białek NF κ B nie zachodzi (Rys.8.17.).

NF κ B może być mobilizowany na skutek indukcji kinazy białkowej PI3K, prowadzącej do fosforylacji kinazy białkowej Akt. W rezultacie dochodzi do fosforylacji kinazy białkowej C. Sprawdzone zatem, czy ligaza Pellino3 pełni rolę w aktywacji NF κ B poprzez modulację aktywacji PI3K oraz kinazy białkowej C.

Podczas odczytu wyników eksperymentów Western blotting, na membranie nitrocelulozowej nie zaobserwowano detekcji sygnału pochodzącego od kinazy białkowej C i Akt w BMDM i THP-1 traktowanych IFN β . Aby wykluczyć udział tych kinaz w szlaku sygnałowym transdukowanym IFN typu I, BMDM WT i *Peli3*^{-/-} traktowano IFN β w obecności i przy braku inhibitora kinazy PI3K – wortmanniny, a także w obecności i przy braku inhibitora kinazy białkowej C – Ro318220. Następnie określono zmiany poziomu ekspresji genów kodujących Cxcl10 oraz Cxcl11, a także zmiany wydzielania cytokin Cxcl10 i Cxcl11. Otrzymane wyniki wykazały, że PI3K oraz kinaza białkowa C nie biorą udziału w kaskadzie sygnalizacyjnej aktywowanej IFN typu I, ponieważ dodatek wortmanniny oraz Ro318220 nie wpływa na poziom ekspresji genów *Cxcl10* i *Cxcl11* (Rys.8.26., Rys.8.28), a także nie wpływa na poziom wydzielania cytokin Cxcl10 i Cxcl11, zarówno w BMDM WT i *Peli3*^{-/-}, jak i w THP-1 WT i Pellino3 KO (Rys.8.27., Rys.8.29).

W kolejnym etapie sprawdzono czy obserwowany efekt hamowania ekspresji genów kodujących cytokiny *Cxcl10*, *CXCL10* i *Cxcl11* oraz obniżenie poziomu cytokin kodowanych przez te geny w komórkach z nokautem ligazy ubikwityny jest powiązane z aktywacją czynnika transkrypcyjnego NFκB, na skutek stymulacji komórek IFNβ. W tym celu użyto inhibitor NFκB, JSH23, który dodawano do komórek na godzinę przed traktowaniem. Zaobserwowano, że zahamowanie aktywności NFκB inhibitorem JSH23 prowadziło do obniżenia ekspresji genu kodującego *Cxcl10* oraz zahamowania ekspresji genu kodującego *Cxcl11* w komórkach BMDM WT traktowanych IFNβ (Rys.8.18.). Dodatkowo zaobserwowano, że w komórkach BMDM WT poziom wydzielania cytokiny *Cxcl10* jest obniżony w stosunku do komórek traktowanych jedynie IFNβ, zaś cytokina *Cxcl11* nie jest produkowana w komórkach BMDM WT (Rys.8.20.). Otrzymane wyniki wydają się być spójne z eksperymentami przeprowadzonymi przy użyciu techniki Western blotting, gdzie pokazano, że w komórkach BMDM WT zachodzi translokacja do jądra komórkowego białek NFκB, p65, RelB i cRel (Rys.8.16.).

Natomiast w THP-1 WT stymulowanych IFNβ, aktywacja szlaku NFκB nie jest kluczowym procesem, co potwierdzają wyniki, w których użycie inhibitora JSH23 nie wpływa na ekspresję genu kodującego *CXCL10*, sugerując, że NFκB nie wiąże się do promotora *CXCL10* (Rys.8.19.). Jednakże produkcja cytokiny *CXCL10* jest częściowo zależna od aktywacji NFκB, gdyż użycie inhibitora JSH23 w komórkach THP-1 WT stymulowanych IFNβ prowadzi do obniżenia poziomu wydzielania cytokiny *CXCL10*, w porównaniu z poziomem wydzielania tej cytokiny przy braku JSH23 (Rys.8.21.). W eksperymentach przeprowadzonych przy użyciu techniki Western blotting pokazano, że w THP-1 WT zachodzi translokacja do jądra komórkowego jedynie białka p65 (Rys.8.17.), sugerując, że w THP-1 aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFκB na skutek pobudzenia szlaku sygnałowego od IFN typu pierwszego zachodzi tylko częściowo, co jest spójne z wynikami otrzymanymi przy użyciu inhibitora JSH23. Jak pokazano na rysunkach 8.3., 8.4., 8.5., 8.6., ligaza ubikwityny Pellino3 wpływa na ekspresję genów *Cxcl10*, *Cxcl11* i *CXCL10* oraz na produkcję cytokin kodowanych przez te geny. Otrzymane wyniki eksperymentów przeprowadzonych z użyciem inhibitora NFκB sugerują, że aktywacja i translokacja do jądra komórkowego NFκB może być jednym z procesów zaangażowanych w produkcję cytokin transdukowanych IFNβ, dlatego nasuwa się wniosek, że Pellino3 może wpływać na ekspresję i

wydzielanie cytokin *Cxcl10*, *Cxcl11* i *CXCL10*, poprzez regulację kaskady sygnałowej NFκB.

W następnym etapie sprawdzono czy obserwowany efekt hamowania ekspresji genów kodujących *Cxcl10*, *CXCL10* i *Cxcl11* oraz obniżenie poziomu cytokin kodowanych przez te geny, w komórkach z nokautem ligazy ubikwityny na skutek stymulacji komórek IFNβ jest powiązane z degradacją proteasomu 26S. W tym celu użyto inhibitor proteasomu 26S, MG132, który dodawano do komórek na godzinę przed traktowaniem.

Zaobserwowano, że zahamowanie procesu degradacji proteasomalnej inhibitorem MG132 prowadziło do obniżenia ekspresji genu kodującego *Cxcl10* oraz zahamowania ekspresji genu kodującego *Cxcl11* w komórkach BMDM WT traktowanych IFNβ (Rys.8.22.). Ponadto zaobserwowano zahamowanie wydzielania cytokin *Cxcl10* oraz *Cxcl11* w BMDM WT preinkubowanych inhibitorem Mg132 i stymulowanych IFNβ (Rys.8.24.). Zaobserwowane wyniki w BMDM typu dzikiego są spójne z obserwacjami w THP-1 WT stymulowanych IFNβ w obecności inhibitora proteasomu 26S. Zahamowanie procesu degradacji proteasomalnej poprzez dodatek inhibitora MG132 prowadziło do zahamowania ekspresji genu kodującego *CXCL10* (Rys.8.23.), co odzwierciedliło się w produkcji cytokiny *CXCL10*, której wydzielanie również zostało zahamowane (Rys.8.25.). Proteolityczna degradacja białka inhibitorowego IκBα przez układ ubikwityna-proteasom 26S jest niezbędna do aktywacji i translokacji NFκB do jądra komórkowego. Na rysunkach: 8.3., 8.4., 8.5., 8.6. pokazano, że ligaza ubikwityny Pellino3 wpływa na ekspresję genów *Cxcl10*, *Cxcl11* i *CXCL10* oraz na produkcję cytokin kodowanych przez te geny. Dodatkowo na rysunkach 8.10. i Rys.8.11. zaobserwowano zahamowanie procesu degradacji podjednostki inhibitorowej IκBα w komórkach z nokautem białka Pellino3. Otrzymane wyniki sugerują, że ligaza ubikwityny Pellino3 pełni rolę w procesie degradacji podjednostki inhibitorowej IκBα w proteasomie 26S.

Ubikwitynacja obok fosforylacji pełni kluczową rolę w regulacji przekazywania sygnału indukowanego przez IFN I. Najlepiej poznaną rolą ubikwitynacji jest kowalencyjna modyfikacja białek, które następnie kierowane są do degradacji w proteasomie. W pierwszym etapie procesu ubikwitynacji, ubikwityna (Ub) ulega aktywacji przez enzym E1 w reakcji zależnej od ATP, co skutkuje utworzeniem kompleksu tioestrowego Ub-E1. W drugim etapie ubikwitynacji, aktywowana Ub jest kierowana do aktywnego centrum enzymu E2, w rezultacie tworząc tioester Ub-E2. W

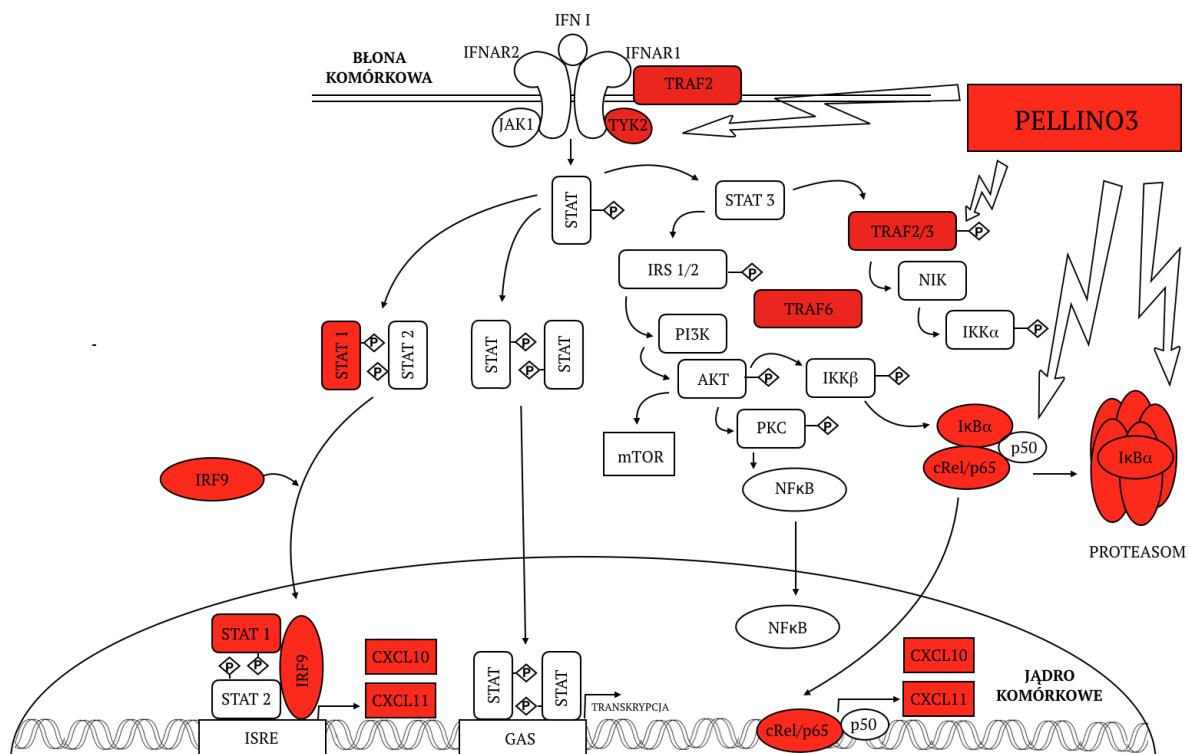
trzecim etapie następuje koniugacja Ub z białkowym substratem w obecności ligazy ubikwityny. Ub zawiera 7 lizyn, do których mogą zostać dołączone kolejne cząsteczki Ub, tworząc łańcuch poliubikwityny. W rezultacie białko oznaczone łańcuchem poliubikwityny może być kierowane do proteasomu 26S. Proteasom 26S jest to kompleks proteazy zależnej od ATP, zawierający rdzeń katalityczny (20S) i część regulacyjną (19S). [Wu, 2007]. Kanoniczna ścieżka aktywująca NFκB polega na proteolitycznej degradacji białka inhibitorowego IκB przez układ ubikwityna-proteasom 26S prowadząc do aktywacji i translokacji NFκB do jądra komórkowego. Z kanoniczną ścieżką aktywacji NFκB silnie są związane białka TRAF, TRAF2 i TRAF6, które mogą działać jako ligazy ubikwityny. Aktywowane białka TRAF katalizują auto-poliubikwitynację TRAF oraz poliubikwitynację białek RIP i NEMO związaną z łańcuchami poliubikwityny połączonymi z K63. W rezultacie dochodzi do indukcji białka TAK1, co z kolei prowadzi do aktywacji kompleksu kinaz IKK (IKKα, IKKβ i NEMO), a w konsekwencji dochodzi do fosforylacji IκB przez kinazę IKKβ, a następnie IκB jest ubikwitynowane i kierowane do degradacji w proteasomie 26S [Wu, 2007].

W przypadku alternatywnej ścieżki aktywacji NFκB, w komórkach w stanie spoczynku kinaza NIK związana jest z kompleksem TRAF2/3 oraz cIAPs, który to poprzez ubikwitynację kinazy NIK kieruje ją do degradacji. Pobudzenie komórek czynnikiem aktywującym niekanoniczną ścieżkę NFκB prowadzi do związania TRAF2 do pobudzonego receptora. W konsekwencji cIAPs ubikwitynuje TRAF3, kierując je do degradacji. W konsekwencji kinaza NIK zostaje uwolniona od TRAF2, zaś NIK inicjuje dalsze etapy kaskady sygnalizacyjnej NFκB. Rezultatem aktywacji NIK jest fosforylacja kinazy IKKα, która w konsekwencji fosforyluje białko p100, które w następnym etapie jest kierowane do poliubikwitynacji i degradacji proteasomalnej C-końcowej domeny białka p100. Domena N-końcowa nie jest degradowana w proteasomie, generując białko p52, które następnie tworzy heterodimer p52/RelB, który w rezultacie jest translokowany do jądra komórkowego [Yang i wsp. 2005; Michel i wsp. 2014; Bonizzi i Karin, 2004].

Zarówno w kanonicznej jak i niekanonicznej kaskadzie NFκB kluczową rolę odgrywają białka TRAF. IFN typu I są zdolne do indukcji kanonicznej ścieżki prowadzącej do aktywacji NFκB, w której zachodzi auto-poliubikwitynacja TRAF6 oraz poliubikwitynacja kinazy NEMO. W rezultacie, znajdujący się w cytoplazmie komórki nieaktywny kompleks p65-p50-IκBα zostaje aktywowany, następuje fosforylacja IκBα, które następnie ulega degradacji w proteasomie 26S. W konsekwencji dimer p65/p50

jest translokowany do jądra komórkowego, w którym produkowane są cytokiny *Cxcl10* i *Cxcl11*. W niniejszej pracy pokazano, że nokaut ligazy ubikwityny Pellino3 skutkuje zahamowaniem powyższych etapów szlaku sygnałowego. Dane literaturowe sugerują, że białko TRAF6 jest bezpośrednio rekrutowane przez ligazę ubikwityny Pellino3 w kaskadzie sygnalizacyjnej IL1R prowadzącej do aktywacji kinaz MAPK, JNK i p38, a w rezultacie indukcji czynników transkrypcyjnych cJUN, ELK1 i CREB [Butler i wsp. 2005]. Dodatkowo w szlaku przekazywania sygnału TLR3 Pellino3 oddziałuje z białkiem TRAF6 prowadząc do ubikwitynacji tego białka, a w rezultacie dochodzi do zmniejszenia indukcji IRF7, co skutkuje hamowaniem ekspresji IFN I [Siednienko i wsp. 2012]. Otrzymane wyniki oraz dane literaturowe pozwalają zaproponować model szlaku sygnałowego, w którym ligaza ubikwityny Pellino3 może oddziaływać z TRAF6, skutkując aktywacją i degradacją I κ B α w proteasomie 26S oraz translokacją do jądra komórkowego białek p65/p50. Jak do tej pory brak doniesień w literaturze o oddziaływaniu ligazy ubikwityny z innymi białkami TRAF. W niniejszej pracy pokazano, że nokaut ligazy ubikwityny Pellino3 skutkuje zahamowaniem translokacji do jądra komórkowego białka RelB, a użycie inhibitorów szlaku NF κ B oraz proteasomu 26S prowadzi do obniżenia poziomu produkcji chemokin. Obserwowane rezultaty mogą mieć miejsce na skutek oddziaływania białka Pellino3 z TRAF2, które w aktywowanej IFN typu I ścieżce sygnałowej, wiąże się z podjednostką IFNAR1 receptora dla IFN I [Yang i wsp. 2008].

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują na rolę ligazy ubikwityny Pellino3 jako pozytywnego regulatora szlaków sygnałowych IFN typu I. Pellino3 reguluje ekspresję mRNA dla *Cxcl10*, *CXCL10* i *Cxcl11* oraz wydzielanie cytokin *Cxcl10*, *CXCL10* i *Cxcl11*. Brak Pellino3 objawia się zmniejszeniem fosforylacji kinazy TYK2, w kaskadzie sygnalizacyjnej JAK-STAT, co skutkuje słabszą fosforylacją czynnika transkrypcyjnego STAT1 i powoduje mniej wydajną translokację do jądra komórkowego dimeru STAT1/IRF9. W szlaku przekazywania sygnału aktywującym NF κ B, ligaza ubikwityny Pellino3 wpływa na degradację podjednostki inhibitorowej I κ B oraz na translokację do jądra komórkowego podjednostek Rel.



Rys. 10.1.: Proponowany mechanizm pozytywnej regulacji transkrypcji ISG, Cxcl10 oraz Cxcl11 w szlakach sygnałowych aktywowanych IFN typu I, przez ligazę ubikwityny Pellino3.

11. WNIOSKI

- 1) Pellino3 jest pozytywnym regulatorem genów stymulowanych interferonem: Cxcl10, CXCL10 oraz Cxcl11 w szlakach sygnałowych, aktywowanych IFN I
- 2) Pellino3 promuje wydzielanie chemokin Cxcl10, CXCL10 oraz Cxcl11 w szlaku sygnałowym indukowanym IFN typu I
- 3) W szlaku przekazywania sygnału aktywowanym przez IFN typu I, Pellino3 wpływa na aktywację kinazy TYK2, fosforylację STAT1 oraz translokacją kompleksu STAT1-IRF9 do jądra komórkowego
- 4) W kaskadzie sygnalizacyjnej aktywowanej przez IFN I, Pellino3 jest zaangażowane w proces degradacji I κ B α i reguluje proces translokacji do jądra komórkowego czynnika transkrypcyjnego NF κ B

12. LITERATURA

- **Abdolvahab** M. H., Mofrad M. R. K., Schellekens H., Interferon Beta: From Molecular Level to Therapeutic Effects. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 2016; 326: 343-372
- **Bach** E. A., Aguet M., Schreiber R. D., The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, 1997; 15: 563– 591
- **Backer** J. M., Schroeder G. G., Kahn C. R., Myers M. G., Wilden P. A., Cahill D. A., White M. F., Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity maps to insulin receptor regions required for endogenous substrate phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 1367-1374
- **Bai** H., Sakurai T., Fujiwara H., Ideta A., Aoyagi Y., Godkin J. D., Imakawa K., Functions of interferon tau as an immunological regulator for establishment of pregnancy. *Reprod. Med. Biol.*, 2012; 11(3): 109–116
- **Bekisz** J., Schmeisser H., Hernandez J., Goldman N. D., Zoon K. C., Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors*, 2004; 22(4): 243-251
- **Bickel** M., Dveksler G., Dieffenbach C. W., Ruhl S., Midura S. B., Pluznik D. H., Induction of interferon-beta and 2',5'-oligoadenylate synthetase mRNAs by interleukin 6 during differentiation of murine myeloid cells. *Cytokine*, 1990; 2(4): 238-246
- **Bonizzi** G., Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.*, 2004; 25: 280–288
- **Borden** E. C., Sen G. C., Uze G., Silverman R. H., Ransohoff R. M., Foster G. R., Stark G. R. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2007; 6(12): 975-990
- **Boxx** G. M., Cheng G., The Roles of Type I Interferon in Bacterial Infection. *Cell Host Microbe.*, 2016; 19(6): 760-769

-
- **Butler** M. P., Hanly J. A., Moynagh P. N., Kinase-active interleukin-1 receptor-associated kinases promote polyubiquitination and degradation of the Pellino family: direct evidence for PELLINO proteins being ubiquitin-protein isopeptide ligases. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282(41): 29729-29737
 - **Butler** M. P., Hanly J. A., Moynagh P. N., Pellino3 is a novel upstream regulator of p38 MAPK and activates CREB in a p38-dependent manner. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280(30): 27759-27768
 - **Capon** D. J., Shepard N. M., Goeddel D. V., Two distinct families of human and bovine interferon-alpha genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Mol. Cell. Biol.* 1985; 5: 768-779
 - **Chang** M., Jin W., Sun S. C., Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nat. Immunol.*, 2009; 10(10): 1089-1095
 - **Cheallaigh** C. N., Sheedy F. J., Harris J., Muñoz-Wolf N., Lee J., West K., McDermott E. P., Smyth A., Gleeson L. E., Coleman M., Martinez N., Hearnden C. H. A., Tynan G. A., Carroll E. C., Jones S. A., Corr S. C., Bernard N. J., Hughes M. M., Corcoran S. E., O'Sullivan M., Fallon C. M., Kornfeld H., Golenbock D., Gordon S. V., O'Neill L. A. J., Lavelle E. C., Keane J., A Common Variant in the Adaptor Mal Regulates Interferon Gamma Signaling. *Immunity*, 2016; 44(2): 368-379
 - **Choi** K. C., Lee Y. S., Lim S., Choi H. K., Lee C. H., Lee E. K., Hong S., Kim I. H., Kim S. J., Park S. H., Smad6 negatively regulates interleukin 1-receptor-Toll-like receptor signaling through direct interaction with the adaptor Pellino-1. *Nature Immunol.*, 2006; 7:1057–1065
 - **Clark** K., Takeuchi O., Akira S., Cohen P., The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the I κ B kinase family during Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011; 108(41): 17093–17098
 - **Clemens** M. J., McNurlan M. A., Regulation of cell proliferation and differentiation by interferons. *Biochem J.*, 1985; 226(2): 345–360

-
- **Conze** D. B., Wu C. J., Thomas J. A., Landstrom A., Ashwell J. D., Lys63-Linked Polyubiquitination of IRAK-1 Is Required for Interleukin-1 Receptor- and Toll-Like Receptor-Mediated NF- κ B Activation. *Mol. Cell. Biol.*, 2008; 28(10): 3538–3547
 - **Darnell** J. E., Kerr I. M., Stark G. R., Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science*, 1994; 264: 1415-1421
 - **De Maeyer** E., De Maeyer-Guignard J., Type I Interferons. *Inrrm. Rev. Imniunol.*, 1998; 17: 53-13
 - **De Weerd** N. A., Samarajiwa S. A., Hertzog P. J., Type I Interferon Receptors: Biochemistry and Biological Functions. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282(28): 20053-20057
 - **Decker** T., Kovarik P., Meinke A., GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.*, 1997; 17: 121-134
 - **DeStefano** E., Friedman R. M., Friedman-Kien A. E., Goedert J. J., Henriksen D., Preble O. T., Sonnabend J. A., Vilček J., Acid-Labile Human Leukocyte Interferon in Homosexual Men with Kaposi's Sarcoma and Lymphadenopathy. *J. Infect. Dis.*, 1982; 146(4): 451-459
 - **Dhib-Jalbut** S., Marks S., Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*, 2010; 74: S17-S24
 - **Dorner** F. K., Scriba M., Weil R., Interferon: Evidence for Its Glycoprotein. *Nature. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1973; 70(7): 1981-1985
 - **Farber** J. M., Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 1997; 61(3): 246-257.
 - **Feinstein** S. I., Mory Y., Chernajovsky Y., Maroteaux L., Ni U., Lavie U., Revel M., Family of human alpha-interferon-like sequences. *Mol. Cell. Biol.* 1985; 5: 510-517

-
- **Filipi M.** and Jack S., Interferons in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Int. J. MS Care.*, 2020; 22(4): 165–172.
 - **Flores I.**, Mariano T. M., Pestka S., Human interferon omega (omega) binds to the alpha/beta receptor. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266(30): 19875-19877.
 - **Fox B. A.**, Sheppard P. O., O'Hara P. J., The Role of Genomic Data in the Discovery, Annotation and Evolutionary Interpretation of the Interferon-Lambda Family. *PLoS One*, 2009; 4(3): 4933
 - **Friedman R. M.** and Contente S., Treatment of Hepatitis C Infections with Interferon: A Historical Perspective. *Hepat. Res. Treat.*, 2010; 2010: 323926
 - **Frucht D. M.**, Fukao T., Bogdan C., Schindler H., O'Shea J. J., Koyasu S., IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.*, 2001; 22: 556– 560
 - **Fu-Wang P.**, Zhao-Jun D., Li-Shu Z., Zhi-Ping X., Han-Chun G., Hui Z., Wu-Ping L., Yun-De H., Purification of recombinant human interferon- ϵ and oligonucleotide microarray analysis of interferon- ϵ -regulated genes. *Protein Expr. Purif.*, 2007; 53: 356–362
 - **Fukao T.**, Matsuda S., Koyasu S., Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J. Immunol.*, 2000; 164: 64– 71
 - **Gauzzi M. C.**, Velazquez L., McKendry R., Mogensen K. E., Fellous M., Pellegrini S., Interferon- α -dependent Activation of Tyk2 Requires Phosphorylation of Positive Regulatory Tyrosines by Another Kinase. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 20494-20500
 - **Gessani S.**, Belardelli F., IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1998; 9: 117– 123

-
- **Gille H.**, Sharrocks A. D., Shaw P. E., Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature*, 1992; 358: 414-417
 - **Goh E. T.**, Arthur J. S., Cheung P. C., Akira S., Toth R., Cohen P., Identification of the protein kinases that activate the E3 ubiquitin ligase Pellino 1 in the innate immune system. *Biochem. J.*, 2012; 441: 339–346
 - **Golab J.**, Zagozdzon, Stoklosa T., Kaminski R., Kozar K., Jakobisiak M., Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18—a bridge too far? *Immunol. Lett.*, 2000; 72: 153– 157
 - **Goldstein G.**, Laszlo J., The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. *CA Cancer J. Clin.*, 1988; 38(5): 258-277
 - **Green D. S.** Young H. A., Valencia J. C., Current prospects of type II interferon γ signaling and autoimmunity. *J. Biol. Chem.*, 2017; 292(34): 13925-13933
 - **Großhans J.**, Schnorrer F., Nüsslein-Volhard C., Oligomerisation of Tube and Pelle leads to nuclear localisation of Dorsal. *Mechanisms of Development*, 1999; 81(1–2): 127-138
 - **Guo B.**, Chang E. Y., Cheng G., The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J. Clin. Invest.*, 2008; 118: 1680-1690
 - **Gupta S.**, Jiang M., Pernis A. B., IFN- α Activates Stat6 and Leads to the Formation of Stat2:Stat6 Complexes in B Cells. *J. Immunol.*, 1999; 163: 3834-3841
 - **Harper M. S.**, Guo K., Gibbert K., Lee E. J., Dillon S. M., Barrett B. S., McCarter M. D., Hasenkrug K. J., Dittmer U., Wilson C. C., Santiago M. L., Interferon- α Subtypes in an Ex Vivo Model of Acute HIV-1 Infection: Expression, Potency and Effector Mechanisms. *PLoS Pathog*, 2015; 11(11): 6001-6013
 - **Hauptmann R.**, Swetly P., A novel class of human type I interferons. *Nucleic Acids Res.*, 1985; 13: 4739-4749

-
- **Havell** E. A., Berman B., Ogburn C. A., Bergt K., Pauckert K., Vilcek J., Two Antigenically Distinct Species of Human Interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975; 72(6): 2185-2187
 - **Hertzog** P. J., Hwang S. Y., Kola I., Role of interferons in the regulation of cell proliferation, differentiation, and development. *Mol. Reprod. Dev.*, 1994; 39(2): 226-232.
 - **Hervas-Stubbs** S., Perez-Gracia J. L., Rouzaut A., Sanmamed M. F., Le Bon A., Melero I., Direct Effects of Type I Interferons on Cells of the Immune System. *Clin. Cancer Res.*, 2011; 17: 2619-2267].
 - **Hibino** Y., Mariano T. M., Kumar C. S., Kozak C. A., Pestka S., Expression and reconstitution of a biologically active mouse interferon gamma receptor in hamster cells. Chromosomal location of an accessory factor. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 6948 – 6951
 - **Hirsch** M., Knight J., Tobita M., Soltys J., Panitch H., Mao-Draayer Y., The effect of interferon-beta on mouse neural progenitor cell survival and differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 388(2): 181-186.
 - **Hu** W., Jain A., Gao Y., Dozmorov I. M., Mandraju R., Wakeland E. K., Pasare C., Differential outcome of TRIF-mediated signaling in TLR4 and TLR3 induced DC maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015; 112(45): 13994–13999
 - **Huizen** M. and Kikkert M., The Role of Atypical Ubiquitin Chains in the Regulation of the Antiviral Innate Immune Response. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2020; 7: 392
 - **Iglesias** M., Arun A , Chicco M., Lam B., Talbot C. C., Ivanova V., Lee W. P. A., Brandacher G., Raimondi G., Type-I Interferons Inhibit Interleukin-10 Signaling and Favor Type 1 Diabetes Development in Nonobese Diabetic Mice. *Front. Immunol.*, 2018; 9: 1565
 - **Isaacs** A., Lindenmann J., Virus Interference. I. The Interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1957; 147(927): 258-267

-
- **Iwanaszko** M. and Kimmel M., NF- κ B and IRF pathways: cross-regulation on target genes promoter level. *BMC Genomics*. 2015; 16(1): 307
 - **Jensen** L. E., Whitehead A. S., Pellino2 activates the mitogen activated protein kinase pathway. *FEBS Lett.*, 2003; 545: 199–202
 - **Jensen** L. E., Whitehead A. S., Pellino3, a novel member of the Pellino protein family, promotes activation of c-Jun and Elk-1 and may act as a scaffolding protein. 2003; *J. Immunol.*, 171(3): 1500-1506
 - **Jiang** Z., Johnson H. J., Nie H., Qin J., Bird T. A., Li X., 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.*, 2003; 278(13): 10952-10956
 - **Kaur** S., Sassano A., Dolniak B., Joshi S., Majchrzak-Kita B., Baker D.P., Hay N., Fish E. N., Plataniias L. C., Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 4808-4813
 - **Kim** T. W., Yu M., Zhou H., Cui W., Wang J., DiCorleto P., Fox P., Xiao H., Li X., Pellino 2 is critical for Toll-like receptor/interleukin-1 receptor (TLR/IL-1R)-mediated post-transcriptional control. *J. Biol. Chem.*, 2012 287(30): 25686-25695
 - **Kotenko** S. V., Gallagher G., Baurin V. V., Lewis-Antes A., Shen M., Shah N. K., Langer J. A., Sheikh F., Dickensheets H., Donnelly R. P., IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology*, 2003; 4(1): 69-77
 - **Kopitar-Jerala** N., The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. *Front. Immunol.*, 2017; 8: 873
 - **Krause** C. D., Pestka S., Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. *Pharmacol. Ther.*, 2005; 106: 299–346

-
- **Kuo P.**, Scofield B. A., Yu I., Chang F., Ganea D., Yen J., Interferon- β modulates inflammatory response in cerebral ischemia. *J. Am. Heart. Assoc.*, 2016; 5: e002610
 - **LaFleur D. W.**, Nardelli B., Tsareva T., Mather D., Feng P., Semenuk M., Taylor K., Buergin M., Chinchilla D., Roshke V., Chen G., Ruben S. M., Pitha P. M., Coleman T. A., Moore P. A., Interferon- κ , a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276(43): 39765-39771
 - **Lau S. A.**, Der S. D., Read S. E., Williams B. R., Regulation of tumor necrosis factor receptor expression by acid-labile interferon- α from AIDS sera. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1991; 7(6): 545-552
 - **Lawn R. M.**, Adelman J., Franke A. E., Houck C. M., Gross M., Najarian R., Goeddel D. V., Human fibroblast interferon gene lacks introns. *Nucleic. Acids. Res.*, 1981; 9(5): 1045–1052
 - **Lee Y. S.**, Kim J. H., Kim S. T., Kwon J. Y., Hong S., Kim S. J., Park S. H., 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.*, 2010; 393: 836–843
 - **Lefèvre F.**, Guillomot M., D'Andréa S., Battegay S., La Bonnardière C., Interferon- δ : the first member of a novel type I interferon family. *Biochimie*. 1998; 80(8-9): 779-788
 - **Lekmine F.**, Uddin S., Sassano A., Parmar S., Brachmann S. M., Majchrzak B., Sonenberg N., Hay N., Fish E. N., Plataniotis L. C., Activation of the p70 S6 kinase and phosphorylation of the 4E-BP1 repressor of mRNA translation by type I interferons. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 27772-27780
 - **Li S. F.**, Zhao F. R., Shao J. J., Xie Y. L., Chang H. Y., Zhang Y. G., Interferon- ω : Current status in clinical applications. *Int. Immunopharmacol.* 2017; 52: 253-260

-
- **Lin C. C.**, Huoh Y. S., Schmitz K. R., Jensen L. E., Ferguson K. M., Pellino proteins contain a cryptic FHA domain that mediates interaction with phosphorylated IRAK1. *Structure*, 2008; 16(12): 1806-1816
 - **Livak K. J.**, Schmittgen T. D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 2001; 25: 402–408
 - **Luthra P.**, Sun D., Silverman R. H., He B., Activation of IFN- β expression by a viral mRNA through RNase L and MDA5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011; 108(5):2118-2123
 - **Mariano T. M.**, Kozak C. A., Langer J. A., Pestka S., The mouse immune interferon receptor gene is located on chromosome 10. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 5812– 5814
 - **Meinke A. L.**, Barahmand-Pour F., Wöhrl S., Stoiber D., Decker T., Activation of different Stat5 isoforms contributes to cell-type-restricted signaling in response to interferons. *Mol. Cell Biol.*, 1996; 16: 6937-6944
 - Michel M., Wilhelmi I., Schultz A-S., Preussner M., Heyd F., Activation-induced Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 3 (Traf3) Alternative Splicing Controls the Noncanonical Nuclear Factor κ B Pathway and Chemokine Expression in Human T Cells. *J Biol Chem.*, 2014; 289(19): 13651–13660
 - **Milne D. M.**, Campbell D. G., Caudwell F. B., Meek D. W., Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 9253-9260
 - **Moynagh P. N.**, The roles of Pellino E3 ubiquitin ligases in immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014; 14(2): 122-131
 - **Murphy L. O.**, Smith S., Chen R. H., Fingar D. C., Blenis J., Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.*, 2002; 4: 556-564

-
- **Nardelli B.**, Zaritskaya L., Semenuk M., Cho Y. H., LaFleur D. W., Shah D., Ullrich S., Girolomoni G., Albanesi C., Moore P. A., Regulatory effect of IFN-kappa, a novel type I IFN, on cytokine production by cells of the innate immune system. *J. Immunol.*, 2002; 169(9): 4822-4830
 - **Nathan C. F.**, Murray H. W., Wiebe M. E., Rubin B. Y., Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.*, 1983; 158(3): 670-689
 - **Nguyen K. B.**, Watford W. T., Salomon R., Hofmann S. R., Pien G. C., Morinobu A., Gadina M., O'Shea J. J., Biron C. A., Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science*, 2002; 297: 2063-2066
 - **Ohlsson M.**, Feder J., Cavalli-Sforza L. L., Von Gabain A., Close linkage of alpha and beta interferons and infrequent duplication of beta interferon in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1985; 82(13): 4473-4476
 - **Ordureau A.**, Smith H., Windheim M., Peggie M., Carrick E., Morrice N., Cohen P., The IRAK-catalysed activation of the E3 ligase function of Pellino isoforms induces the Lys63-linked polyubiquitination of IRAK1. *Biochem. J.*, 2008; 409(1): 43-52
 - **Oritani K.**, Tomiyama Y., Interferon- ζ /Limitin: Novel Type I Interferon That Displays a Narrow Range of Biological Activity. *Int. J. Hematol.* 2004; 80: 325-331
 - **Park W. J.**, Han S. H., Kim D. H., Song Y. J., Lee J. B., Park S. Y., Song C. S., Lee S. W., Choi I. S., Induction of IFN- β through TLR-3- and RIG-I-Mediated Signaling Pathways in Canine Respiratory Epithelial Cells Infected with H3N2 Canine Influenza Virus. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2021; 31(7): 942-948
 - **Pfeffer L. M.**, Mullersman J. E., Pfeffer S. R., Murti A., Shi W., Yang C. H., STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor. *Science*, 1997; 276: 1418-1420

-
- **Pfizenmaier** K., Wiegmann K., Scheurich P., Kronke M., Merlin G., Aguet M., Knowles B. B., Ucer U., High affinity human IFN-gamma-binding capacity is encoded by a single receptor gene 141: 856–860 located in proximity to c-ras on human chromosome region 6q16 to 6q22. *J. Immunol.*, 1988
 - **Piasecki** E., Human Acid-Labile Interferon α . *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1999; 47(2): 89-98
 - **Platanias** L. C., Sweet M. E., Interferon alpha induces rapid tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 3143-3146
 - **Qing** Y. and Stark G. R., Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon- γ . *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 41679-41685
 - **Qian** C., An H., Yu Y., Liu S., Cao X., TLR agonists induce regulatory dendritic cells to recruit Th1 cells via preferential IP-10 secretion and inhibit Th1 proliferation. *Blood*, 2007; 109(8): 3308-3315
 - **Rani** M. R., Foster G. R., Leung S., Leaman D., Stark G. R., Ransohoff R. M., Characterization of beta-R1, a gene that is selectively induced by interferon beta (IFN-beta) compared with IFN-alpha. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271(37): 22878-22884
 - **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; 2021:6 668463
 - **Rich** T., Allen R. L., Lucas A. M., Stewart A., Trowsdale J., Pellino-related sequences from *Caenorhabditis elegans* and *Homo sapiens*. *Immunogenetics*, 2000; 52(1-2): 145-149
 - **Roberts** R. M., Interferon-Tau, a Type 1 Interferon Involved in Maternal Recognition of Pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2007; 18(5-6): 403–408

-
- **Rubinstein M.**, Rubinstein S., Familletti P. C., Miller R. S, Waldman A. A., Pestka S., Human leukocyte interferon: production, purification to homogeneity, and initial characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1979; 76(2): 640-644
 - **Sasaki R.**, Kanda T., Nakamoto S., Haga Y., Nakamura M., Yasui S., Jiang X., Wu S., Arai M., Yokosuka O. Natural interferon-beta treatment for patients with chronic hepatitis C in Japan. *World J. Hepatol.*, 2015; 7(8): 1125–1132.
 - **Satyanarayanan S. K.**, Kebir D. E., Soboh S., Butenko S., Sekheri M., Saadi J., Peled N., Assi S., Othman A., Schif-Zuck S., Feuermann Y., Barkan D., Sher N., Filep J. G., Ariel A., IFN- β is a macrophage-derived effector cytokine facilitating the resolution of bacterial inflammation. *Nat. Commun.*, 2019; 10(1): 3471
 - **Schauvliege R.**, Janssens S., Beyaert R., Pellino proteins are more than scaffold proteins in TLR/IL-1R signalling: a role as novel RING E3-ubiquitin-ligases. *FEBS Lett.*, 2006; 580: 4697–4702
 - **Schindler H.**, Lutz M. B., Rollinghoff M., Bogdan C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J. Immunol.*, 2001; 166: 3075– 3082
 - **Schroder K.**, Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A., Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.*, 2004; 75(2): 163-189
 - **Sheikh F.**, Dickensheets H., Gamero A. M., Vogel S. N., Donnelly R. P., An essential role for IFN- β in the induction of IFN-stimulated gene expression by LPS in macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 2014; 96(4): 591–600.
 - **Sheppard P.**, Kindsvogel W., Xu W., Henderson K., Schlutsmeyer S., Whitmore T. E., Kuestner, R. Garrigues U., Birks C., Roraback J., Ostrander C., Dong D., Shin J., Presnell S., Fox B., Haldeman B., Cooper E., Taft D., Gilbert T., Grant F. J., Tackett M., Krivan W., McKnight G., Clegg C., Foster D., Klucher K. M., IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.*, 2003; 4(1): 63-68

-
- **Shuai** K., Horvath C. M., Tsai Huang L. H., Qureshi S. A., Cowburn D., Darnell J. E., Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*, 1994; 76: 821-828
 - **Siednienko** J., Jackson R., Mellett M., Delagic N., Yang S., Wang B., Tang L. S., Callanan J. J., Mahon B. P., Moynagh P. N., Pellino3 targets the IRF7 pathway and facilitates autoregulation of TLR3- and viral-induced expression of type I interferons. *Nat. Immunol.*, 2012; 13(11): 1055-1062
 - **Smith** H., Liu X.-Y., Dai L., Goh E. T. H., Chan A.-T., Xi J., Seh C.-C., Qureshi I. A., Lescar J., Ruedl C., Gourlay R., Morton S., Hough J., Mciver E. G., Cohen P., Cheung P. C. F., The role of TBK1 and IKK ϵ in the expression and activation of Pellino 1. *Biochem. J.*, 2011; 434: 537.
 - **Soh** J., Donnelly R. O., Kotenko S., Mariano T. M., Cook J. R., Wang N., Emanuel S., Schwartz B., Miki T., Pestka S., Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon γ receptor. *Cell*, 1994; 76: 793–802
 - **Sommereyns** C., Paul S., Staeheli P., Michiels T.: IFN-lambda (IFN- λ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog.*, 2008; 4: e1000017
 - **Steen** H. C. and Gamero A. M. STAT2 phosphorylation and signaling. *JAKSTAT*, 2013; 2(4): e25790.
 - **Strelow** A., Kollwe C., Wesche H., Characterization of Pellino2, a substrate of IRAK1 and IRAK4. *FEBS. Lett.*, 2003; 547: 157–161.
 - **Stewart** W. E., Blalock J. E., Burke D. C., Chang C., Dunnick J. K., Falcoff E., Friedman R. M., Galasso G.J., Joklik W. K., Vitek J. T., Youngner J. S, Zoon K. C., Interferon nomenclature. *Nature*, 1980; 286: 110
 - **Taniguchi** T., Mantei N., Schwarzstein M., Nagata S., Muramatsu M., Weissmann C., Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. *Nature*, 1980; 285: 547-549

-
- **Thompson** M. R., Kaminski J. J., Kurt-Jones E. A., Fitzgerald K. A., Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses*, 2011; 3(6): 920–940
 - **Towbin** H., Staehelin T., Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1979; 76(9): 4350-4354
 - **Trent** J. M., Olson S., Lawn R. M., Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982; 79(24): 7809–7813
 - **Tzieply** N., Kuhn A. M., Morbitzer D., Namgaladze D., Heeg A., Schaefer L., von Knethen A., Jensen L. E., Brüne B., OxLDL inhibits LPS-induced IFN β expression by Pellino3- and IRAK1/4-dependent modification of TANK. *Cell Signal.*, 2012 24(6): 1141-1149
 - **Uddin** S., Lekmine F., Sharma N., Majchrzak B., Mayer I., Young P. R., Bokoch G.M., Fish E. N., Plataniias L. C., The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 27634-27640
 - **Uddin** S., Majchrzak B., Woodson J., ArunKumar P., Alsayed Y., Pine R., Young P. R., Fish E. N., Plataniias L. C., Activation of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase by Type I Interferons. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 30127-30131
 - **Uddin** S., Sher D. A., Alsayed Y., Pons S., Colamonici O. R., Fish E. N., White M. F., Plataniias L. C., Interaction of p59fyn with interferon-activated Jak kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 235(1): 83-88
 - **Uddin** S., Sweet M., Colmonici O. R., Krolewski J. J., Plataniias L. C., The vav proto-oncogene product (p95vav) interacts with the Tyk-2 protein tyrosine kinase. *FEBS Lett.*, 1997; 403: 31-34

-
- **Uddin S.**, Yenush L., Sun X. J., Sweet M. E., White M. F., Platanius L. C., Interferon-alpha engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 3'-kinase. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 15938-15941
 - **Utay N. S.** and Douek D. C., Interferons and HIV Infection: The Good, the Bad, and the Ugly. *Pathog. Immun.*, 2016; 1(1): 107–116
 - **Vilcek J.**: Novel interferons. *Nat. Immunol.*, 2003; 4: 8-9
 - **Wheelock E. F.**, Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*, 1965; 149(3681): 310-311
 - **Wu H.**, TNF Receptor Associated Factors (TRAFs). Springer Science + Business Media, LLC, 2007; Chapter 7: 80-92
 - **Xi Y.**, Day S. L., Jackson R. J., Ranasinghe C., Role of novel type I interferon epsilon in viral infection and mucosal immunity. *Mucosal Immunol.*, 2012; 5(6): 610–622.
 - **Xiao Y.**, Jin J., Chang M., Chang J. H., Hu H., Zhou X., Brittain G. C., Stansberg C., Torkildsen Ø., Wang X., Brink R., Cheng X., Sun S. C., Peli1 promotes microglia-mediated CNS inflammation by regulating Traf3 degradation. *Nat. Med.*, 2013; 19(5): 595-602
 - **Xiao Y.**, Jin J., Zou Q., Hu H., Cheng X., Sun S. C., Peli1 negatively regulates type I interferon induction and antiviral immunity in the CNS. *Cell Biosci.*, 2015; 5: 34
 - **Xiao H.**, Qian W., Staschke K., Qian Y., Cui G., Deng L., Ehsani M., Wang X., Qian Y. W., Chen Z. J., Gilmour R., Jiang Z., Li X., Pellino 3b negatively regulates interleukin-1-induced TAK1-dependent NF kappaB activation. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283(21): 14654-14664
 - **Yan H.**, Krishnan K., Greenlund A. C., Gupta S., Lim J. T., Schreiber R. D., Schindler C. W., Krolewski J. J., Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFNaR1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *EMBO J.*, 1996; 15: 1064-107

-
- **Yang** B. S., Hauser C.A., Henkel G., Colman M. S., Van Beveren C., Stacey K.J., Hume D.A., Maki R.A., Ostrowski M.C., Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol. Cell. Biol.*, 1996; 16: 538-547
 - **Yang** C. H., Murti A., Pfeffer L. M., Interferon induces NF-kappa B-inducing kinase/tumor necrosis factor receptor-associated factor-dependent NF-kappa B activation to promote cell survival. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 31530-31536
 - **Yang** C. H., Murti A., Pfeffer S. R., Basu L., Kim J. G., Pfeffer L. M., IFN alpha/beta promotes cell survival by activating NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 13631-13636
 - **Yang** C. H., Murti A., Pfeffer S. R., Fan M., Du Z., Pfeffer L. M., The Role of TRAF2 Binding to the Type I Interferon Receptor in Alternative NFkB Activation and Antiviral Response. *J Biol Chem.* 2008; 283(21): 14309–14316
 - **Yang** C. H., Shi W., Basu L., Murti A., Constantinescu S. N., Blatt L., Croze E., Mullersman J. E., Pfeffer L. M., Direct Association of STAT3 with the IFNAR-1 Chain of the Human Type I Interferon Receptor. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 8057-8061
 - **Yang** L., M., Xue Q. H., Sun L., Zhu Y. P., Liu W. J., Cloning and characterization of a novel feline IFN-omega. *J. Interf. Cytokine Res.*, 2007; 27: 119-127
 - **Young** H. A., Regulation of interferon-gamma gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.*, 1996; 16: 563– 568
 - **Yu** K. Y., Kwon H. J., Norman D. A. M., Vig E., Goebel M. G., Harrington M. A., Cutting Edge: Mouse Pellino-2 Modulates IL-1 and Lipopolysaccharide Signaling. *J. Immunol.*, 2002; 169 (8): 4075-4078
 - **Zanin** N., Viaris de Lesegno C., Lamaze C., Blouin C. M., Interferon Receptor Trafficking and Signaling: Journey to the Cross Roads. *Front. Immunol.*, 2021; 11: 615603

13. SPIS RYCIN I RYSUNKÓW

13.1. RYCINY

Ryc. 5.1. Szlak aktywujący JAK-STAT.....	24
Ryc. 5.2. Szlak aktywujący MAPK.....	26
Ryc. 5.3. Szlak aktywujący NFκB.....	27
Ryc. 5.4. Kanoniczny szlak aktywowany IFNγ.....	30
Ryc. 5.5. Niekanoniczny szlak aktywowany IFNγ.....	31
Ryc. 5.6. Szlak aktywowany IFNλ.....	33
Rys.10.1. Proponowany mechanizm pozytywnej regulacji transkrypcji ISG, Cxcl10, CXCL10 oraz Cxcl11 w szlakach sygnałowych aktywowanych IFN typu I, przez ligazę ubikwityny Pellino3.....	97

13.2. RYSUNKI

Rys. 8.1. Poziom ekspresji genów kodujących <i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl11</i> w BMDM WT w odpowiedzi na IFNβ.	61
Rys. 8.2. Kinetyka zmian ekspresji genów kodujących <i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl11</i> w BMDM WT w odpowiedzi na IFNβ.....	62
Rys. 8.3. Poziom ekspresji genów kodujących <i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl11</i> w BMDM WT i BMDM Peli3 ^{-/-} w odpowiedzi na IFNβ.....	63
Rys. 8.4. Poziom ekspresji genów kodujących <i>CXCL10</i> w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFNβ.....	64
Rys. 8.5. Poziom wydzielanych cytokin <i>Cxcl9</i> , <i>Cxcl10</i> i <i>Cxcl11</i> w BMDM WT i Peli3 ^{-/-} w odpowiedzi na IFNβ.....	65
Rys. 8.6. Poziom wydzielanych cytokin <i>CXCL9</i> , <i>CXCL10</i> oraz <i>CXCL11</i> w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFNβ.....	66
Rys. 8.7. Poziom ekspresji genów <i>Ifnar1</i> i <i>Ifnar2</i> (A) w BMDM WT i Peli3 ^{-/-} oraz genów <i>IFNAR1</i> i <i>IFNAR2</i> (B) w THP-1 WT i Pellino3 KO.....	67
Rys. 8.8. Analiza aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT1 w BMDM WT oraz Peli3 ^{-/-} w odpowiedzi na IFNβ.....	68
Rys. 8.9. . Analiza aktywacji kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych w THP-1 WT oraz Pellino3 KO w odpowiedzi na IFNβ.....	69

Rys. 8.10. Analiza stopnia degradacji podjednostki inhibitorowej I κ B α w BMDM WT i Peli3 ^{-/-} w odpowiedzi na IFN β	71
Rys. 8.11. Analiza stopnia degradacji podjednostki inhibitorowej I κ B α w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β	71
Rys. 8.12. Analiza aktywacji kinaz MAPK w BMDM WT i Peli3 ^{-/-} w odpowiedzi na IFN β	72
Rys. 8.13. Analiza aktywacji kinaz MAPK w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β	73
Rys. 8.14. Analiza translokacji do jądra czynnika transkrypcyjnego STAT1 i czynnika regulatorowego IRF9 w BMDM WT i Peli3 ^{-/-} w odpowiedzi na IFN β	74
Rys. 8.15. Analiza translokacji do jądra czynnika transkrypcyjnego STAT1 i czynnika regulatorowego IRF9 w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β	75
Rys. 8.16. Analiza translokacji do jądra białek: p65, cRel oraz RelB w BMDM WT i Peli3 ^{-/-} w odpowiedzi na IFN β	76
Rys. 8.17. Analiza translokacji do jądra białek: p65, cRel oraz RelB w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β	77
Rys. 8.18. Poziom ekspresji genów kodujących <i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl11</i> w BMDM WT oraz Peli3 ^{-/-} w odpowiedzi na traktowanie komórek IFN β , w obecności JSH23.....	78
Rys. 8.19. Poziom ekspresji genu kodującego <i>CXCL10</i> w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na traktowanie komórek IFN β , w obecności JSH23.....	79
Rys. 8.20. Poziom wydzielanych cytokin <i>Cxcl10</i> i <i>Cxcl11</i> w BMDM WT i Peli3 ^{-/-} , w odpowiedzi na IFN β , w obecności JSH23.....	79
Rys. 8.21. Poziom wydzielanej cytokiny <i>CXCL10</i> w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β , w obecności JSH23.....	80
Rys. 8.22. Poziom ekspresji genów kodujących <i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl11</i> w BMDM WT oraz Peli3 ^{-/-} w odpowiedzi na traktowanie komórek IFN β , w obecności MG132.....	81
Rys. 8.23. Poziom ekspresji genu kodującego <i>CXCL10</i> w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na traktowanie komórek IFN β , w obecności MG132.....	82
Rys. 8.24. Poziom wydzielanych cytokin <i>Cxcl10</i> i <i>Cxcl11</i> w BMDM WT i Peli3 ^{-/-} , w odpowiedzi na IFN β , w obecności MG132.....	82
Rys. 8.25. Poziom wydzielanej cytokiny <i>CXCL10</i> w THP-1 WT i Pellino3 KO w odpowiedzi na IFN β , w obecności MG132.....	83
Rys. 8.26. Poziom ekspresji genów kodujących <i>Cxcl10</i> oraz <i>Cxcl11</i> w BMDM WT i Peli3 ^{-/-} w odpowiedzi na traktowanie komórek IFN β , w obecności wortmanniny.....	84

Rys. 8.27. Poziom wydzielanych cytokin <i>Cxcl10</i> i <i>Cxcl11</i> w BMDM WT i <i>Peli3</i> ^{-/-} , w odpowiedzi na IFN β , w obecności wortmanniny.....	85
Rys. 8.28. Poziom ekspresji genów kodujących <i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl11</i> w BMDM WT oraz <i>Peli3</i> ^{-/-} w odpowiedzi na traktowanie komórek IFN β , w obecności Ro318220.....	85
Rys. 8.29. Poziom wydzielanych cytokin <i>Cxcl10</i> i <i>Cxcl11</i> w BMDM WT i <i>Peli3</i> ^{-/-} , w odpowiedzi na IFN β , w obecności Ro318220.....	86