

Received: 2014.08.13  
Accepted: 2015.04.30  
Published: 2015.07.27

## Ubikwityna jako regulator wytwarzania IFN w odpowiedzi przeciwwirusowej\*

### Ubiquitin as a regulator of IFN production in the antiviral response

Karolina Matković, Małgorzata Mitkiewicz, Janusz Matuszyk

Laboratorium Białek Sygnalowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

#### Streszczenie

Wytwarzanie interferonów typu I (IFN) ma duże znaczenie w odpowiedzi odpornościowej. Po wykryciu patogenów komórki gospodarza szybko aktywują wrodzone mechanizmy odpornościowe związane z wytwarzaniem cytokin, zwłaszcza IFN, w celu zahamowania infekcji wirusowej. W początkowej fazie zakażenia kaskady sygnałowe prowadzą do aktywacji czynników regulatorowych interferonu (IRF-3, IRF-7) oraz indukcji szlaku NF- $\kappa$ B, bezpośrednio wpływających na poziom ekspresji genów IFN. Właściwa kontrola wytwarzania IFN, odbywająca się w wyniku ubikwitynacji, umożliwia utrzymanie równowagi między aktywacją i hamowaniem odpowiedzi ze strony układu odpornościowego na skutek infekcji. Badania ostatnich lat wskazują, że ubikwitynacja białek może dotyczyć zarówno ich proteasomalnej degradacji, jak również zachodzić odmiennie niż w sposób klasyczny regulując ich aktywność. Rodzaj ubikwitynacji zależy przede wszystkim od sposobu przyłączenia ubikwityny do białka docelowego i typu utworzonego łańcucha ubikwitynowego, ale również od aktywności proteaz z rodziny DUBs. W szlaku ubikwityny istnieje wiele potencjalnych celów terapeutycznych i dlatego dokładniejsze poznanie mechanizmu ubikwitynacji oraz udziału ubikwityny w regulacji wytwarzania IFN jest ważnym celem prowadzącym zarówno do opracowania nowych terapii przeciwwirusowych, jak i leczenia chorych z zaburzeniami autoimmunizacyjnymi.

#### Słowa kluczowe:

ubikwityna • interferon • regulacja odpowiedzi przeciwwirusowej

#### Summary

Type I interferons (IFNs) are important in the immune response. After pathogen detection, host cells rapidly trigger innate immune mechanisms such as inflammatory cytokines production, thus leading to the eradication of the invading virus. Such mechanisms engage signaling cascades which, in the initial phase of infection, lead to the activation of the NF- $\kappa$ B pathway and IFN regulatory factors (IRF-3, IRF-7) which directly control the production of IFNs. Proper regulation of IFN induction takes place by ubiquitination and allows to maintain a balance between the activation and inhibition of the immune system response due to an infection. Studies in recent years indicate that ubiquitination of proteins can affect both proteasomal degradation as well as the non-canonical pathway which results in the regulation of their activity. The type of ubiquitination primarily depends on the attachment of ubiquitin chain to

\* Praca finansowana z programu statutowego nr 11/2015 Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu.



	the target protein but also on the activity of proteases from DUBs family. The ubiquitin pathway holds many potential therapeutic targets. Thus, the more detailed understanding of the mechanism of ubiquitination and the role of ubiquitin involved in IFNs production pathways may provide a turning point for both antiviral therapy and autoimmune diseases.
<b>Key words:</b>	<b>ubiquitin • interferon • regulation of the antiviral response</b>
<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1162988">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1162988</a>
<b>Word count:</b>	2566
<b>Tables:</b>	–
<b>Figures:</b>	4
<b>References:</b>	61

**Adres autora:** dr hab. Janusz Matuszyk, prof. PAN, Laboratorium Białek Sygnałowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: matuszyk@iitd.pan.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **CARD** – domena aktywacji i rekrutacji kaspaz (caspase activation recruitment domain); **Cardif** – białko adaptorowe stymulujące syntezę IFN- $\beta$  zawierające domenę CARD (CARD adapter inducing IFN- $\beta$ ); **DUBs** – enzymy deubikwitynacji (deubiquitinating enzymes); **IFN** – interferon typu I; **IKK** – kinaza inhibitora I $\kappa$ B (I $\kappa$ B kinase); **IPS-1** – białko aktywujące promotor IFN- $\beta$  1 (IFN- $\beta$  promoter stimulator 1); **IRAK** – kinaza białkowa z rodziny kinaz związanych z receptorem interleukiny (IL-1R-associated kinase); **IRF** – czynnik regulatorowy IFN (IFN regulatory factor); **ISRE** – elementy odpowiedzi stymulowanej przez IFN (IFN-stimulated response elements); **MAVS** – białko MAVS (mitochondria antiviral signaling); **MyD88** – białko adaptorowe MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88); **PAMP** – wzorce molekularne związane z patogenami (pathogen-associated molecular patterns); **PRR** – receptor rozpoznający wzorce (pattern recognition receptor); **RIG-I** – receptor RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1); **RIP1** – kinaza białkowa RIP1 (receptor-interacting protein 1); **TBK-1** – kinaza białkowa TBK-1 (TANK binding kinase 1); **TLR** – receptory Toll-podobne (Toll-like receptors); **TRADD** – białko adaptorowe TRADD (tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein); **TRAF** – czynnik związany z receptorem TNF (tumor necrosis factor receptor-associated factor); **TRIF** – białko adaptorowe zawierające domenę TIR indukujące IFN- $\beta$  (TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- $\beta$ ); **UBD** – domena wiążąca ubikwitynę (ubiquitin-binding domain); **VISA** – białko adaptorowe indukowane przez wirus (virus-induced signaling adapter).

## WSTĘP

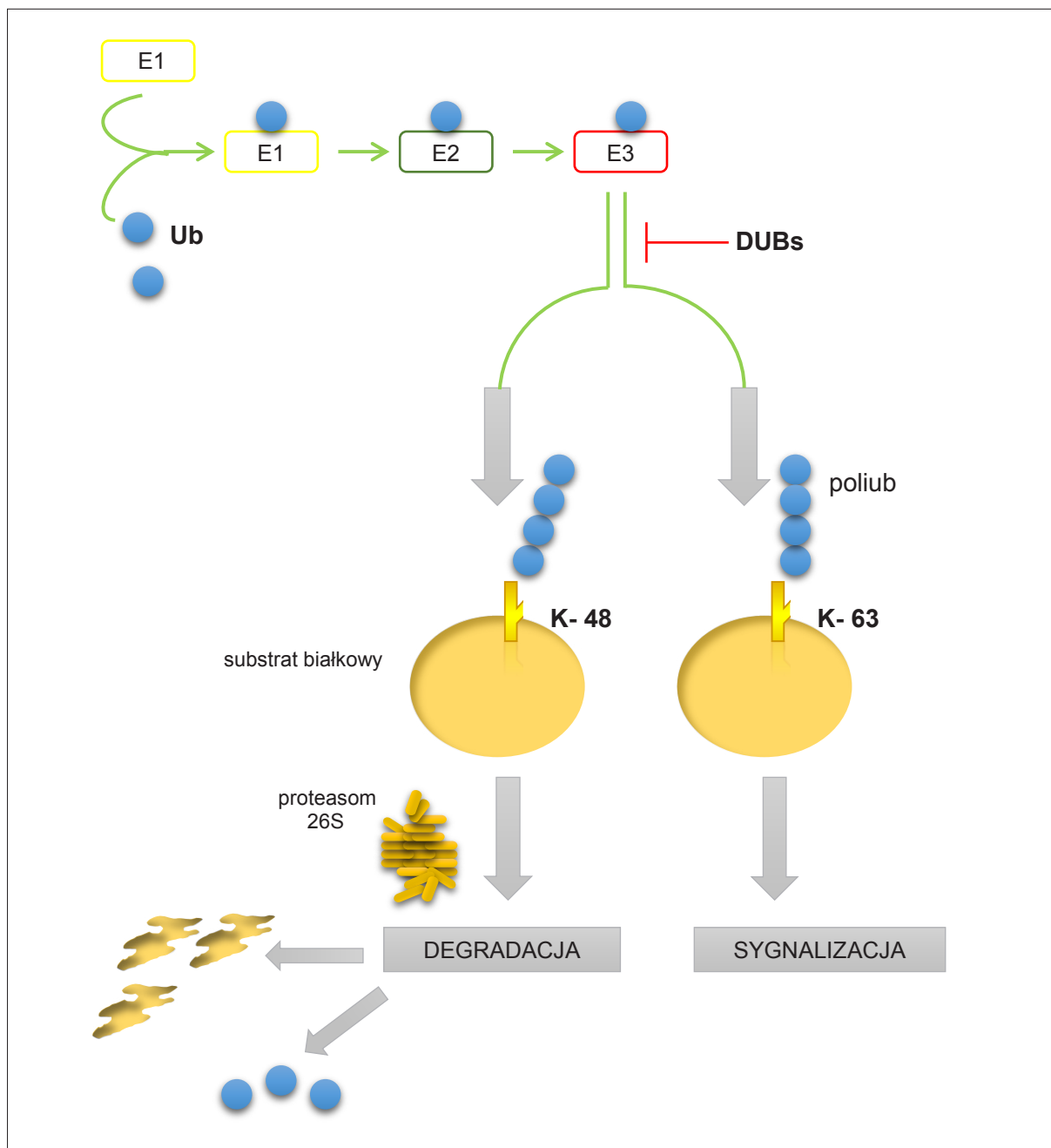
W wyniku inwazji patogennych wirusów następuje mobilizacja komórek układu odpornościowego gospodarza. W odpowiedzi organizmu na infekcję ważny udział mają cytokiny, zwłaszcza interferony typu I (IFN), których zadanie sprowadza się do synchronizacji odporności wrodzonej i nabytej, a tym samym skutecznego hamowania replikacji i rozprzestrzeniania się wirusów. Dzięki receptorom rozpoznającym wzorce molekularne (pattern recognition receptors - PRR), obecnym w komórkach odpornościowych, jest możliwe rozpoznawanie tzw. egzogennych sygnałów niebezpieczeństwa, czyli molekularnych wzorców związanych z patogenami (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) [26,34]. Tego typu rozpoznanie podczas infekcji wirusowej odbywa się z udziałem różnych typów receptorów PRR: zakotwiczonych w błonie endosomalnej receptorów Toll-podobnych (TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9) oraz receptorów RIG-I występujących w przestrzeni cytoplazmatycznej. Ich regula-

cja w przebiegu zakażenia oraz obrony organizmu gospodarza przed patogenami odbywa się m.in. w wyniku ubikwitynacji i może znacząco wpływać na dalsze etapy kaskady przekazywania sygnału [11,48]. Ubikwitynacja może w sposób precyzyjny regulować wiele procesów zachodzących w zainfekowanej komórce.

Proces ubikwitynacji jest jedną z wielu potranslacyjnych modyfikacji białek i chociaż wywołuje różnorodne następstwa, charakteryzuje się pewnymi stałymi etapami rozpoznania i modyfikacji substratu białkowego:

- ma charakter odwracalny;
- modyfikacje zachodzą na ściśle określonych aminokwasach (lizyna);
- modyfikacje zmieniają aktywność białek docelowych [38].

Sygnał ubikwitynacji jest następnie rozpoznawany i przetwarzany przez białka, które mają domenę wiążącą ubi-



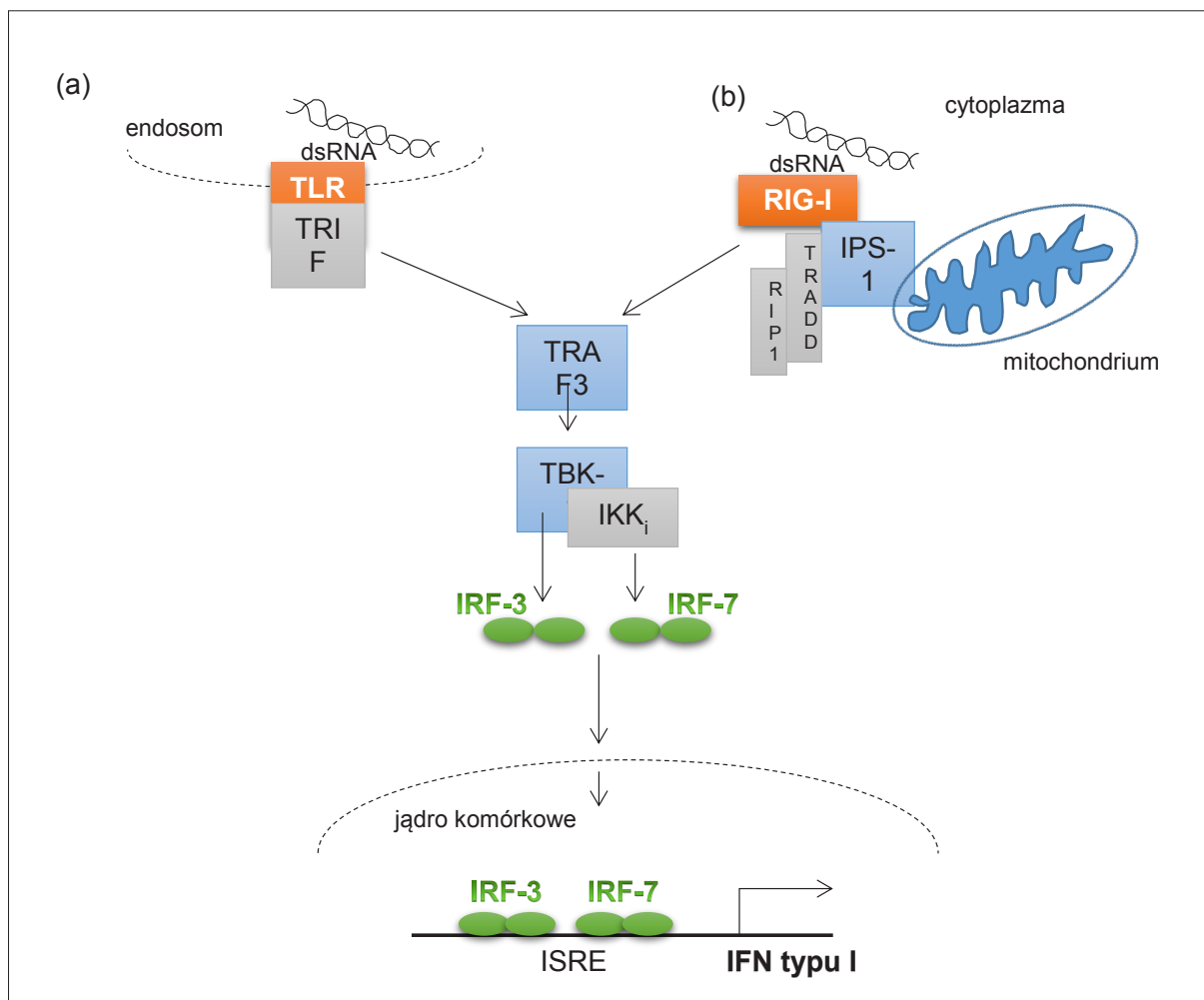
Ryc. 1. Schemat ubikwytynacji „klasycznej” (K-48) zakończonej degradacją substratu białkowego oraz „nieklasycznej” (K-63) prowadzącej do regulacji różnych procesów komórkowych; E1 - enzymy aktywujące ubikwitynę; E2 - enzymy sprzęgające ubikwitynę z białkiem przeznaczonym do zniszczenia; E3 - ligaza ubikwityny rozpoznająca białko przeznaczone do zniszczenia; DUBs - enzymy deubikwytynacji

kwitynę (ubiquitin-binding domain, UBD). Dotąd udało się opisać prawie 200 białek charakteryzujących się obecnością pojedynczej lub też większej liczby domen UBD [24].

Ubikwityna jest integralną częścią systemu ubikwityna-proteasom (ubiquitin-proteasome system, UPS), odpowiedzialnego za degradację ponad 80% białek wewnątrzkomórkowych. Głównym elementem tego systemu jest proteasom 26S - dynamiczny, podjednostkowy kompleks proteolityczny, o masie cząsteczkowej 1500-2000 kD, który

u organizmów eukariotycznych stanowi podstawę nielizosomalnej proteolizy. Zadaniem tej wewnątrzkomórkowej proteazy jest rozpoznanie i degradacja białek znakowanych przez ubikwitynę. Tego typu ukierunkowana proteoliza podlega ścisłej regulacji, a dobór swoistego białka odbywa się na podstawie kontrolowanego powinowactwa ubikwityny do danego substratu. W klasycznym podejściu degradacja proteasomalna umożliwia usunięcie nieprawidłowo sfałdowanych lub uszkodzonych białek. Jednak proces ten, na co wskazują liczne badania, może również skutecznie





Ryc. 2. Aktywacja TLR3 (a) i RIG-I (b) prowadząca do fosforylacji białek IRF-3 i IRF-7 oraz syntezy IFN typu I

kontrolować wiele procesów biologicznych, m.in. przebieg cyklu komórkowego, różnicowanie, wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnałów, mechanizmy naprawcze DNA i programowaną śmierć komórki [45,58]. O charakterze ubikwytynacji i dalszych losach białka docelowego decyduje przede wszystkim rodzaj tworzonych wiązań. Jak wiadomo, ubikwityna jest 76-aminokwasowym białkiem zawierającym siedem reszt lizyny (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63). Może działać w postaci monomeru lub też liniowego łańcucha poliubikwitynowego, powstającego przez tworzenie wiązań izopeptydowych między grupą karboksylową glicyny (G76) jednej ubikwityny, a resztą aminową lizyny następczej cząsteczki tego białka. Łańcuchy poliubikwitynowe tworzone przez przyłączanie się kolejnych ubikwityn za pomocą reszty lizyny 48 (K48), tzw. łańcuchy „klasyczne”, są sygnałem do zniszczenia białka. Jeśli jednak w tworzenie takiego wiązania zaangażowane są reszty lizyny 63 (K63), wówczas powstają łańcuchy „nieklasyczne”, biorące udział w regulacji wielu procesów komórkowych (ryc. 1). Uczestniczą m.in. w regulacji cyklu komórkowego, apoptozy, autofagii, procesów naprawczych DNA i odpowiedzi odpornościowej [24].

Odwracalna ubikwytynacja wpływa na dynamiczną odpowiedź układu odpornościowego, związaną z inwazją patogenów oraz sygnałami pochodzącymi z wnętrza komórki. Bezpośrednio kontroluje wytwarzanie IFN regulując m.in. czynniki transkrypcyjne należące do rodzin IRF i NF- $\kappa$ B.

#### REGULACJA STĘŻENIA IFN W WYNIKU UBIKWITYNACJI

Odkrycie receptorów z rodziny TLR oraz RIG-I, wykazujących zdolność do rozpoznawania komponentów wirusowych, to ważny krok w zrozumieniu zależności między infekcją wirusową i indukcją IFN. Intensywne badania nad mechanizmem wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów w następstwie aktywacji wspomnianych receptorów wykazały, że prowadzi on do aktywacji kinazy białkowej TBK-1 (TANK-binding kinase 1), która w procesie fosforylacji aktywuje odpowiednie czynniki regulatorowe interferonu (IFN regulatory factor, IRF) [21], takie jak IRF-3, IRF-5 i IRF-7. Pod wpływem aktywacji czynniki tworzą dimery (homodimery i/lub heterodimery) i migrują do jądra komórkowego, gdzie przyłączają się w DNA do ele-

mentów odpowiedzi stymulowanych przez interferon (IFN - stimulated response elements, ISRE). Wpływa to na ekspresję genów IFN [6,20].

Umiejscowione w błonach endosomalnych receptory TLR7 i TLR9, aktywowane odpowiednio przez jednoniciowe RNA (np. wirusa grypy) [36] i przez DNA wirusa (np. opryszczki pospolitej) [32], rekrutują białko adaptorowe MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88). Wywołuje to fosforylację kinaz białkowych IRAK4 i IRAK1 za pośrednictwem interakcji domen śmierci (death domain, DD) białek MyD88 i IRAK. Tak zaktywowane kinazy białkowe dysocjują następnie od MyD88 i oddziałują z białkiem adaptorowym TRAF6, indukując wytwarzanie IFN za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych IRF-5 i IRF-7. Białko TRAF6 w kompleksie z dodatkowo rekrutowanymi białkami Ubc13 i Uev1A katalizuje również poliubikwytynację białek za pośrednictwem reszty lizyny 63 w ubikwitynie [56]. Po utworzeniu kompleksu białek IRAK1/TRAF6 z kompleksem białek TAK1/TAB jest pobudzana następnie kinaza inhibitora I $\kappa$ B (IKK - I $\kappa$ B kinase) oraz kinazy MAP (mitogen-activated protein), takie jak JNK i p38 MAPK [60].

W przypadku receptora TLR3, wiążącego dsRNA wirusa, sygnał alarmujący inwazję patogenu jest przekazywany przez białko adaptorowe TRIF. Białko TRIF za pośrednictwem czynnika związanego z receptorem TNF, tzw. TRAF3 (tumor necrosis factor receptor-associated factor), uruchamia szlak sygnału wewnątrzkomórkowego, wywołującego aktywację spokrewnionych z IKK kinaz białkowych TBK-1 i IKKi (inducible I $\kappa$ B kinase), co powoduje fosforylację czynników transkrypcyjnych IRF-3 i IRF-7. Następnie czynniki transkrypcyjne IRF, w postaci homodimerów i/lub heterodimerów, wędrują do jądra komórkowego, gdzie po związaniu się do elementów odpowiedzi ISRE w DNA indukują ekspresję genów kodujących IFN [55] (ryc. 2, szlak a).

Jak już wspomniano, oprócz receptorów z grupy Toll-podobnych, komórki mają również helikazy RIG-I wiążące m.in. wirusowe dsRNA w obrębie cytoplazmy. Multimeryzacja receptora RIG-I, zachodząca na skutek inwazji patogenu, zapoczątkowuje wewnątrzkomórkową kaskadę przekazywania sygnału. W pierwszym etapie receptor RIG-I oddziałuje z pochodzącym z zewnętrznej błony mitochondrialnej białkiem adaptorowym IPS-1 (zwanym również MAVS, VISA lub Cardif). Oddziaływanie zachodzi przez bezpośrednią interakcję domen CARD obu białek, czyli domen aktywacji i rekrutacji kaspaz (caspase activation domain - CARD) w białkach RIG-I i IPS-1 (MAVS) [25]. Następnie IPS-1 rekrutuje TRAF3 za pośrednictwem białka adaptorowego TRADD (tumor necrosis factor receptor type 1 - associated death domain protein). Formowanie kompleksów IPS-1-TRAF3 to główny etap w indukcji odpowiedzi na wirusowe RNA [30,31,47]. TRAF3 jest białkiem adaptorowym, jednak ma także aktywność ligazy E3 ubikwityny i w następstwie autoubikwytynacji TRAF3 rekrutuje kompleks kinaz białkowych TBK-1 i IKKi powodując ich aktywację. W końcowym etapie fosforylacja

czynników transkrypcyjnych IRF-3 i IRF-7 powoduje ich homodimeryzację i/lub heterodimeryzację i transport do jądra komórki, gdzie białka IRF są wiązane do elementów odpowiedzi ISRE w DNA indukując w ten sposób ekspresję genów IFN [1,52,57] (ryc. 2, szlak b).

Wyniki badań nad odpowiedzią odpornościową związaną z infekcją wirusową dowodzą, że bez względu na źródło pochodzenia sygnału, w wyniku aktywacji receptora TLR czy też receptora RIG-I w komórkach pozbawionych czynników transkrypcyjnych IRF-3 i IRF-7 nie zachodzi indukcja syntezy IFN [55].

Rekrutacja białka adaptorowego TRIF do receptora TLR3 oraz białka adaptorowego TRADD do receptora RIG-I, z udziałem m.in. dodatkowo rekrutowanego białka RIP1 (receptor-interacting protein 1), uruchamia jednocześnie szlak sygnałowy aktywujący kinazy białkowe IKK $\alpha$ / $\beta$  i za ich pośrednictwem zapoczątkowuje fosforylację inhibitora I $\kappa$ B [25,28]. W następstwie fosforylacji I $\kappa$ B zostaje uwolniony czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), który po translokacji do jądra komórkowego aktywuje geny cytokin prozapalnych [8,55].

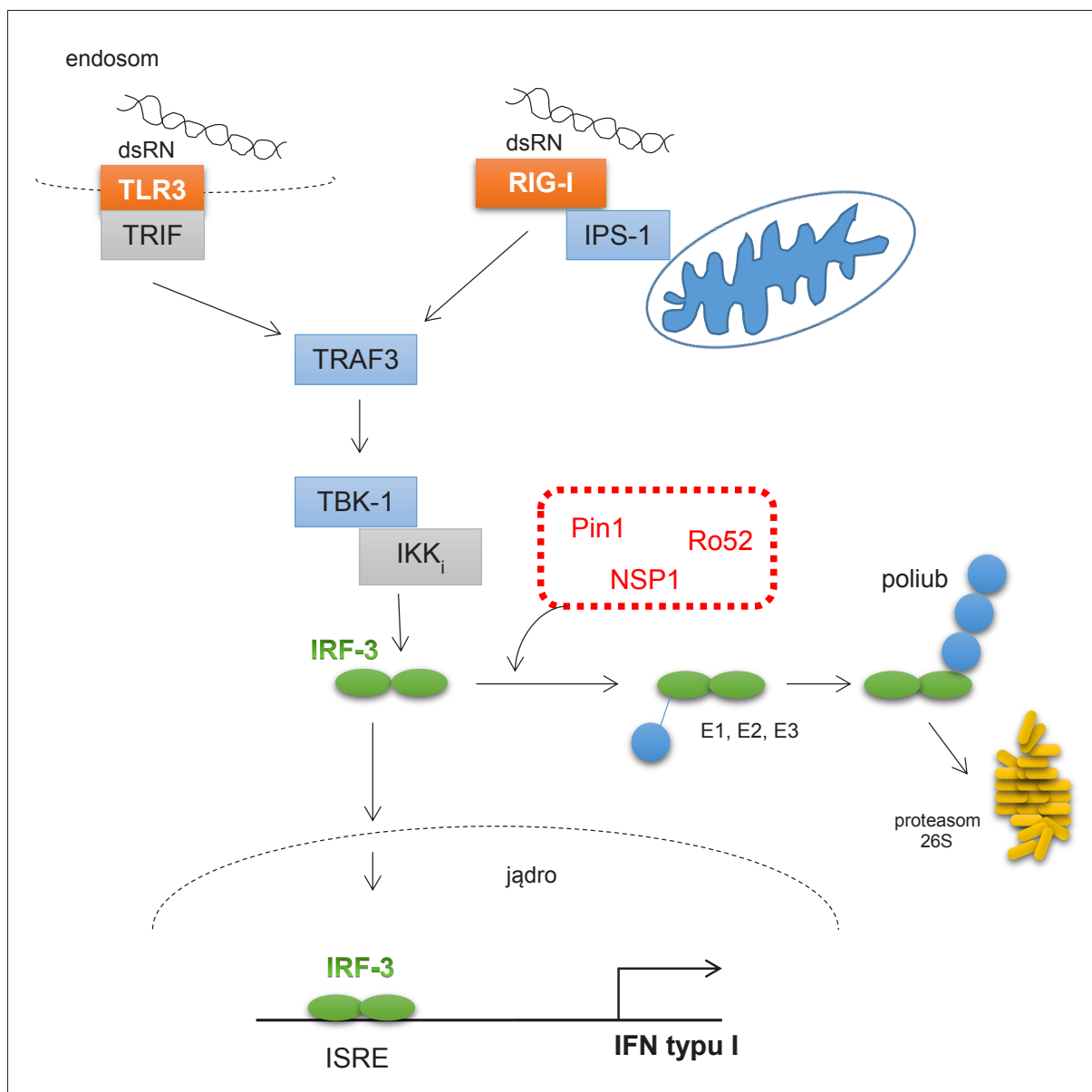
Skutecznym sposobem regulacji wytwarzania IFN na skutek zakażenia wydaje się zatem kontrola aktywności transaktywacyjnej białek z rodziny IRF, zwłaszcza IRF-3 i IRF-7, ale również czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B oraz proteaz z rodziny DUBs (deubiquitinating enzymes). Poznanie zarówno pozytywnej, jak i negatywnej regulacji wspomnianych czynników transkrypcyjnych IRF i NF- $\kappa$ B oraz enzymów deubikwytynacji DUBs jest potrzebne do lepszego zrozumienia związku zaburzeń transdukcji sygnału z mechanizmami obrony przeciwwirusowej oraz udziału ubikwytynacji w kontroli wytwarzania IFN [5,27,35].

### Mechanizm regulacji negatywnej

Degradacja białka IRF-3 zależna od ubikwityny opiera się na dwóch głównych założeniach. W wyniku infekcji wirusowej wiele białek endogennych może w sposób pośredni lub bezpośredni przyczynić się do poliubikwytynacji i zniszczenia białka IRF-3 przez proteasom. Celem takiego procesu jest ochrona komórek gospodarza przed nadmiernym wytwarzaniem IFN. Wykazano również, że białka wirusowe mogą działać jako ligazy E3 ubikwityny. Czynniki transkrypcyjne IRF-3 kierowane są wówczas do proteasomu, a ich degradacja obniża odpowiedź przeciwwirusową stwarzając dogodne warunki do replikacji wirusów [19].

Transdukcja sygnału receptorów TLR3 i RIG-I do wytwarzania IFN, oparta na kaskadowej aktywacji kinaz białkowych, takich jak TAK1 i IKK, wymaga udziału czynnika transkrypcyjnego IRF-3. Potranslacyjne modyfikacje tych białek mają zatem zasadnicze znaczenie w regulacji ich funkcji. Wykazano, że IRF-3 może podlegać negatywnej regulacji z udziałem peptydyloowo-prolylowej izomerazy Pin1 (peptide-prolyl isomerase), katalizującej izomery-





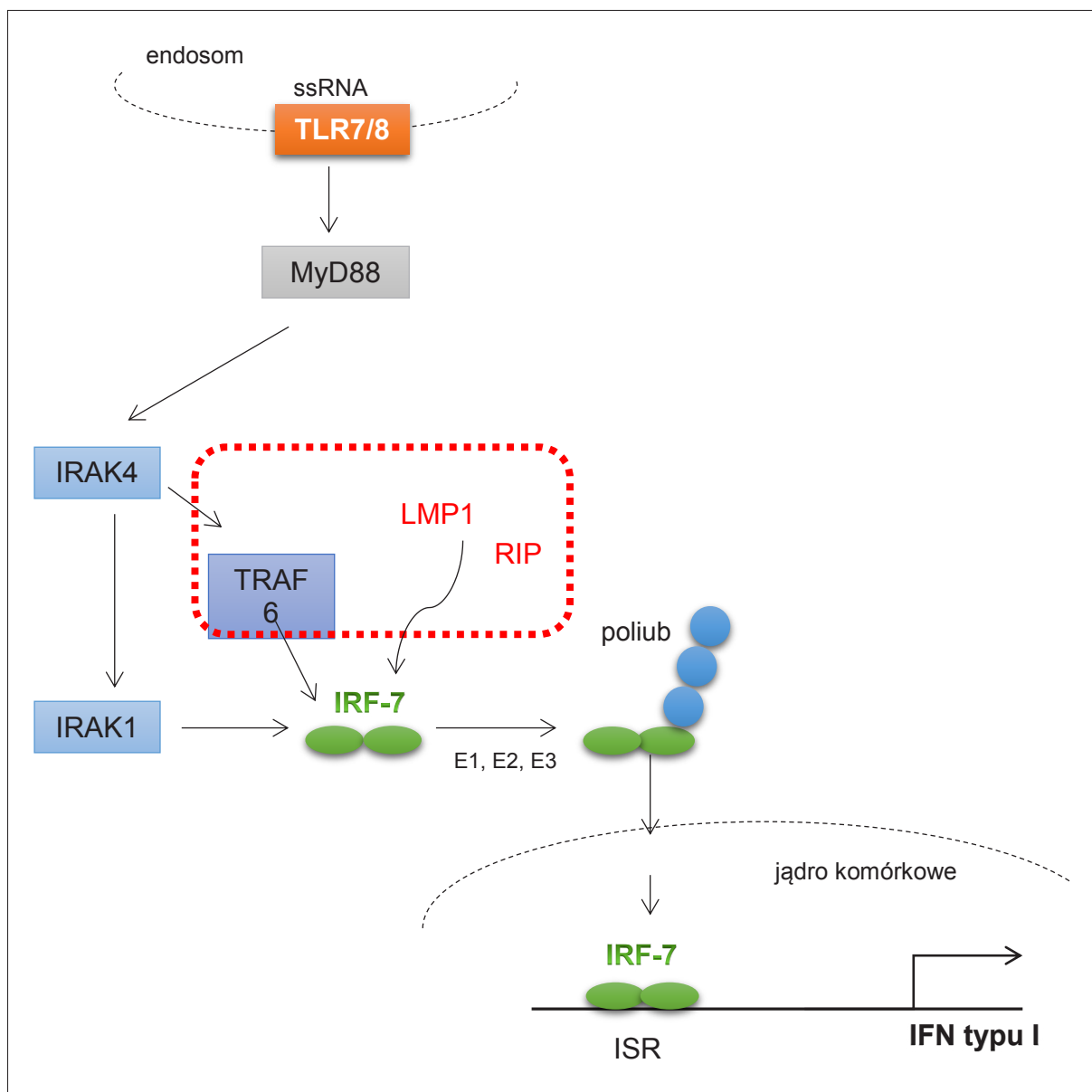
Ryc. 3. Aktywacja TLR3 i RIG-I przez dsRNA wirusa oraz udział białek endogennych Pin1, Ro52 i wirusowych NSP1 w poliubikwytynacji białka IRF-3 oraz jego degradacja negatywnie regulująca wytwarzanie IFN typu I

zanie *cis-trans* fosforylowanego białka IRF. Interakcja IRF-3-Pin1 jest konieczna do zniszczenia białka IRF-3 oraz późniejszej negatywnej regulacji wytwarzania interferonu typu I (INF- $\beta$ ) [2,51]. Jednak, jak wykazały dalsze badania, Pin1 nie katalizuje samodzielnie ubikwytynacji IRF-3 indukowanego wirusem Sendai. Negatywna regulacja IRF-3 wskazuje na dodatkowy udział endogennego białka Ro52, ze względu na budowę należącego do rodziny białek TRIM (tripartite motif). Białko Ro52 wykazuje aktywność ligazy E3 ubikwityny, kierującej IRF-3 bezpośrednio do proteasomu [19].

Ponadto badania dowodzą, że proces negatywnej kontroli czynników transkrypcyjnych IRF może się odbywać z udziałem białek wirusowych. Produkt genu rotawirusu,

którym jest białko NSP1 (non-structural protein 1) wykazuje zdolność wiązania białka IRF-3 i pośredniczy w jego degradacji. Dalsza analiza potwierdziła, że NSP1 pośredniczący w degradacji białka IRF-3 działa na zasadzie ligazy E3 ubikwityny. Aktywność ta wspiera negatywną regulację opartą na systemie ubikwityna-proteasom, hamując w ten sposób ekspresję genu kodującego IFN- $\beta$  [15] (ryc. 3).

Enzym deubikwytynacji A (DUBA), odkryty w badaniach z wykorzystaniem siRNA, jest ważnym regulatorem wytwarzania IFN. Redukcja stężenia białka DUBA w komórce zapewne zwiększa odpowiedź przeciwwirusową indukowaną IFN, podczas gdy jego nadmierne wytwarzanie działa odwrotnie. DUBA, po związaniu TRAF3 o aktywności



Ryc. 4. Aktywacja TLR7/8 przez ssRNA wirusa oraz udział kinazy białkowej RIP1 (RIP) i wirusowej onkoproteiny LMP1 w poliubikwytynacji białka IRF-7 pozytywnie regulującej wytwarzanie IFN typu I

ligazy E3 ubikwityny, rozszczepia łańcuchy ubikwitynowe K63 powodując dysocjację ubikwityny od kompleksu sygnałowego [38]. Dalsze badania pozwoliły na dokładniejszą charakterystykę enzymu DUBA, jako negatywnego regulatora ekspresji genów kodujących IFN, wskazując na brak rekrutacji kinazy białkowej TBK-1 do kompleksu oraz zahamowania fosforylacji białka IRF-3 [27,48].

### Mechanizm regulacji pozytywnej

Zniszczenie znakowanego białka to nie jedyny skutek ubikwytynacji. Badania wykazały, że aktywność transaktywacyjna IRF może być również wzmocniona po przyłączeniu ubikwityny za pomocą reszty lizyny 63 (K63). Przykładem tego jest wzrost aktywności transaktywacyj-

nej IRF-7 w wyniku ubikwytynacji przez białko adaptorne TRAF6, działające także jako ligaza E3 ubikwityny w szlaku sygnalizacyjnym receptorów TLR [19]. Ponadto białko IRF-7 po zakażeniu wirusem Epsteina-Barr (EBV) ulega ubikwytynacji zwiększającej aktywność tego czynnika transkrypcyjnego. Odbyna się to w procesie zależnym od wirusowej onkoproteiny LMP1 (latent membrane protein 1), która stymulując kinazę białkową RIP1 przeprowadza zależną od TRAF6 ubikwytynację białka IRF-7, aktywującego transkrypcję w następstwie związania z elementami odpowiedzi ISRE [44]. Także wyniki doświadczeń z użyciem genu reporterowego lucyferazy w komórkach HEK-293 wskazują na stymulację czynnika transkrypcyjnego IRF-7 zależną od procesu ubikwytynacji [23] (ryc. 4).



Proces pozytywnej regulacji z udziałem ubikwitynacji także dotyczy czynników jądrowych NF- $\kappa$ B, regulując w ten sposób zachodzącą z ich udziałem transdukcję sygnału i transkrypcję genów. U ssaków znanych jest pięć czynników transkrypcyjnych należących do rodziny Rel/NF- $\kappa$ B: NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB oraz c-Rel [9]. W warunkach fizjologicznych białka NF- $\kappa$ B są utrzymywane w cytoplazmie i przestrzeni międzybłonowej mitochondriów [4], w kompleksach z inhibitorami należącymi do rodziny I $\kappa$ B [3]. I $\kappa$ B maskuje w białkach NF- $\kappa$ B sekwencje sygnałowe NLS (nuclear localization sequences). Za fosforylację czynników I $\kappa$ B odpowiadają kinazy IKK stanowiące kompleks aktywnych enzymatycznie podjednostek: IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  oraz IKK $\gamma$ , zwanej NEMO. W wyniku klasycznej stymulacji, np. pod wpływem infekcji wirusowej, IKK $\beta$  przeprowadza fosforylację dwóch reszt seryny w N-końcowej domenie I $\kappa$ B. Ufosforylowane miejsca są rozpoznawane przez ligazę E3 ubikwityny typu SCF, co powoduje ubikwitynację i degradację białka I $\kappa$ B z udziałem proteasomu 26S. W następstwie degradacji dochodzi do odsłonięcia sekwencji NLS w białkach NF- $\kappa$ B, które w formie dimerów przemieszczają się do jądra komórkowego i rozpoznają elementy odpowiedzi w DNA indukując ekspresję genów ważnych dla wielu procesów zachodzących w komórce [13]. W wyniku tego następuje ponowna synteza inhibitora I $\kappa$ B i kumulacja nieaktywnych kompleksów NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B w cytoplazmie i przestrzeni międzybłonowej mitochondriów [4,22].

W odróżnieniu od typowej aktywacji dimerów NF- $\kappa$ B, możliwy jest jeszcze drugi mechanizm indukcji czynników jądrowych, odbywający się z udziałem kinazy białkowej NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase). W obecności cytokin prozapalnych kinaza białkowa NIK fosforyluje i aktywuje kinazę białkową IKK $\alpha$  w sposób alternatywny, co prowadzi do fosforylacji białka prekursorowego NF- $\kappa$ B p100 związanego z RelB. Białko NF- $\kappa$ B p100 ulega następnie ubikwitynacji od strony C-końca łańcucha w domenie ankiry (ankirin repeat domain, ARD), a to w wyniku proteolizy powoduje powstanie NF- $\kappa$ B p52 i aktywnych kompleksów p52/RelB podlegających translokacji do jądra komórkowego [14,16].

Przytoczone wyniki badań wskazują, że kontrola aktywności transaktywacyjnej białek z rodziny czynników regulatorowych interferonu IRF oraz czynników jądrowych NF- $\kappa$ B w odpowiedzi na infekcję wirusową, zachodząca przez szlak ubikwityny, stanowi równie ważny jak degradacja proteasomalna mechanizm regulacyjny wrodzonej odpowiedzi odpornościowej.

## PODSUMOWANIE

W związku z powyższymi doniesieniami wydaje się pewne, że ubikwitynacja nie odnosi się jedynie do znakowania białek przeznaczonych do zniszczenia w proteasomach (ubikwitynacja w sposób „klasyczny”), ale może również znacząco wpływać na regulację aktywności białek w różnych procesach komórkowych (ubikwitynacja w sposób „nieklasyczny”). O charakterze ubikwitynacji i dalszych

losach docelowego białka decyduje przede wszystkim rodzaj wiązań w łańcuchach poliubikwitynowych tworzonych za pomocą reszty lizyny 48 (K48) lub lizyny 63 (K63). W związku z tym zarówno zniszczenie znakowanego białka (regulacja negatywna), jak też jego aktywacja (regulacja pozytywna) kontrolowana w wyniku ubikwitynacji, wydaje się niezbędna i w równym stopniu zaangażowana w kontrolę procesów sygnałowych przez utrzymanie prawidłowej ilości odpowiednich białek sygnałowych i ich pożądaną aktywność.

Wiązanie ubikwityny do białka docelowego to jedna z najbardziej istotnych modyfikacji potranslacyjnych związanych z kontrolą wielu procesów komórkowych. Mechanizmy z udziałem ubikwityny, kiedyś postrzegane wyłącznie jako sygnał do degradacji białek, okazały się znaczące w transdukcji sygnałowej. Dziś wiadomo, że ubikwitynacja jest zaangażowana w regulację wielu procesów zachodzących w komórkach, poczynając od regulacji cyklu komórkowego, apoptozy, endocytozy, autofagii, procesów naprawczych DNA, a na regulacji wrodzonej i nabytej odpowiedzi odpornościowej kończąc. Wyniki badań wskazują jednoznacznie, że ubikwitynacja bierze udział w przekazywaniu sygnałów, także w czasie przeciwwirusowej odpowiedzi układu odpornościowego [37,41]. Najbardziej przekonujące wyniki badań popierające hipotezę o udziale ubikwitynacji w procesach regulacji pozytywnej pochodzą z badań przeprowadzonych na komórkach osteoblastów U2OS zawierających warianty ubikwityny z substytucją aminokwasu K63R. W takich komórkach, po zakażeniu wirusem Sendai, nie dochodziło do dimeryzacji czynników transkrypcyjnych IRF-3 oraz tworzenia łańcuchów poliubikwitynowych K63 [61].

Mechanizmy regulacji wczesnej odpowiedzi odpornościowej na atak patogenu są oparte na utrzymaniu odpowiedniej równowagi w szlakach transdukcji sygnału do wytwarzania IFN. Istnieje wiele przykładów patologicznych następstw związanych z zaburzeniem odpowiedzi przeciwwirusowej i niekontrolowanych stanów zapalnych prowadzących do cukrzycy typu 1 [7], miażdżycy, reumatoidalnego zapalenia stawów czy astmy [33,45]. Aktywacja receptorów TLR i RIG-I oraz związana z tym aktywność transaktywacyjna IRF-7 w przypadku utraty kontroli nad procesami odpornościowymi, nadmiernej aktywacji tych procesów lub też zaburzeń podczas edukacji komórek układu odpornościowego do odróżniania obcych antygenów od własnych, mogą prowadzić do rozwoju chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, m.in. toczenia rumieniowatego układowego [1,42,43]. Jak podkreślają Dikic i wsp., zaburzenia w regulacji procesu ubikwitynacji mogą się objawiać poważnymi konsekwencjami w postaci przewlekłych reakcji przeciwwirusowych i przeciwzapalnych, a także wywoływać zmiany nowotworowe [8,12,29].

W związku z tym, że proces degradacji białka IRF w wyniku ubikwitynacji jest ważnym mechanizmem limitującym wytwarzanie IFN, badania potwierdzają, że utrata kontroli nad układem enzymatycznym szlaku ubikwityny oraz zaburzenia zdolności jego autoregulacji wiążą się



z inicjacją i progresją wielu chorób, w tym oporności na leki i rozwojem nowotworów.

Aktywacja dimerów NF- $\kappa$ B, zachodząca przez zależną od ubikwitynacji degradację I $\kappa$ B utrzymującego czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B w stanie nieaktywnym, gwarantuje poprawną transdukcję sygnału i transkrypcję swoistych genów kodujących cytokiny prozapalne, tym samym pozytywnie kontrolując aktywność receptorów reagujących na pojawiające się infekcje wirusowe. Co ważne, regulacja aktywności transaktywacyjnej NF- $\kappa$ B, zależna od procesu ubikwitynacji, ma również charakter autoregulacyjny, gdyż zwrótnie wpływa na ekspresję genów kodujących takie białka jak Rel, NF- $\kappa$ B p100, NF- $\kappa$ B p105 oraz czynnik I $\kappa$ B [54].

Zrozumienie mechanizmów regulacji aktywności transaktywacyjnej białek z rodziny IRF i znaczącego udziału ubikwitynacji w odpowiedzi przeciwwirusowej jest obiecującą strategią w poszukiwaniu i wyznaczaniu nowych celów terapeutycznych.

W świetle dotychczasowych badań potwierdzonych przytoczonymi tu doniesieniami literaturowymi, ubikwitynacja jako regulator wytwarzania IFN to niewątpliwie ważny mechanizm wpływający na kontrolę układu odpornościowego w wyniku zakażeń i chorób wynikających z autoagresji, a także podstawowy cel w poszukiwaniu skutecznych terapii przeciwwirusowych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Belgnaoui M.S., Paz S., Samuel S., Goulet M.L., Sun Q., Kikkert M., Iwai K., Dikic I., Hiscott J., Lin R.: Linear ubiquitination of NEMO negatively regulates the interferon antiviral response through disruption of the MAVS-TRAF3 complex. *Cell Host Microbe*, 2012; 12: 211-222
- [2] Bibeau-Poirier A., Gravel S.P., Clément J.F., Rolland S., Rodier G., Coulombe P., Hiscott J., Grandvaux N., Meloche S., Servant M.J.: Involvement of the I $\kappa$ B kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *J. Immunol.*, 2006; 177: 5059-5067
- [3] Bonizzi G., Karin M.: The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.*, 2004; 25: 280-288
- [4] Bottero V., Rossi F., Samson M., Mari M., Hofman P., Peyron J.F.: I $\kappa$ B $\alpha$ , the NF- $\kappa$ B inhibitory subunit, interacts with ANT, the mitochondrial ATP/ADP translocator. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 21317-21324
- [5] Chen H.W., King K., Tu J., Sanchez M., Luster A.D., Shresta S.: The roles of IRF-3 and IRF-7 in innate antiviral immunity against dengue virus. *J. Immunol.*, 2013; 191: 4194-4201
- [6] Daffis S., Samuel M.A., Suthar M.S., Keller B.C., Gale M.Jr., Diamond M.S.: Interferon regulatory factor IRF-7 induces the antiviral alpha interferon response and protects against lethal West Nile virus infection. *J. Virol.*, 2008; 82: 8465-8475
- [7] Dasu M.R., Ramirez S., Isseroff R.R.: Toll-like receptors and diabetes: a therapeutic perspective. *Clin. Sci.*, 2012; 122: 203-214
- [8] Dikic I., Crosetto N., Calatroni S., Bernasconi P.: Targeting ubiquitin in cancers. *Eur. J. Cancer*, 2006; 42: 3095-3102
- [9] Dolcet X., Llobet D., Pallares J., Matias-Guiu X.: NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.*, 2005; 446: 475-482
- [10] Eisenächer K., Krug A.: Regulation of RLR-mediated innate immune signaling - it is all about keeping the balance. *Eur. J. Cell Biol.*, 2012; 91: 36-47
- [11] Fang D.F., He K., Wang J., Mu R., Tan B., Jian Z., Li H.Y., Song W., Chang Y., Gong W.L., Li W.H., Wang G.J.: RAD23A negatively regulates RIG-I/MDA5 signaling through promoting TRAF2 polyubiquitination and degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013; 431: 686-692
- [12] Fulda S., Rajalingam K., Dikic I.: Ubiquitylation in immune disorders and cancer: from molecular mechanisms to therapeutic implications. *EMBO Mol. Med.*, 2012; 4: 545-556
- [13] Ghosh S., Karin M.: Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell*, 2002; 109 (Suppl. 1): S81-S96
- [14] Giardino Torchia M.L., Conze D.B., Jankovic D., Ashwell J.D.: Balance between NF- $\kappa$ B p100 and p52 regulates T cell costimulation dependence. *J. Immunol.*, 2013; 190: 549-555
- [15] Graff J.W., Ewen J., Ettayebi K., Hardy M.E.: Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *J. Gen. Virol.*, 2007; 88: 613-620
- [16] Hayden M.S., Ghosh S.: Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev.*, 2004; 18: 2195-2224
- [17] Hedayat M., Netea M.G., Rezaei N.: Targeting of Toll-like receptors: a decade of progress in combating infectious diseases. *Lancet Infect. Dis.*, 2011; 11: 702-712
- [18] Hideshima T., Bradner J.E., Chauhan D., Anderson K.C.: Intracellular protein degradation and its therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 8530-8533
- [19] Higgs R., Jefferies C.A.: Targeting IRFs by ubiquitination: regulating antiviral responses. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008; 36: 453-458
- [20] Honda K., Taniguchi T.: IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006; 6: 644-658
- [21] Honda K., Yanai H., Negishi H., Asagiri M., Sato M., Mizutani T., Shimada N., Ohba Y., Takaoka A., Yoshida N., Taniguchi T.: IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 2005; 434: 772-777
- [22] Huang T.T., Miyamoto S.: Postrepression activation of NF- $\kappa$ B requires the amino-terminal nuclear export signal specific to I $\kappa$ B $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 21: 4737-4747
- [23] Huye L.E., Ning S., Kelliher M., Pagano J.S.: Interferon regulatory factor 7 is activated by a viral oncoprotein through RIP-dependent ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.*, 2007; 27: 2910-2918
- [24] Ikeda F., Crosetto N., Dikic I.: What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling? *Cell*, 2010; 143: 677-681
- [25] Jabłońska A., Paradowska E.: Rola receptorów RIG-I-podobnych w odpowiedzi przeciwwirusowej. *Postepy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 541-556
- [26] Kawai T., Akira S.: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2010; 11: 373-384
- [27] Kayagaki N., Phung Q., Chan S., Chaudhari R., Quan C., O'Rourke K.M., Eby M., Pietras E., Cheng G., Bazan J.F., Zhang Z., Arnott D., Dixit V.M.: DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science*, 2007; 318: 1628-1632



- [28] Kędziora S., Słotwiński R.: Molekularne mechanizmy towarzyszące rozpoznawaniu patogenu przez receptory wrodzonej odporności. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 30-38
- [29] Kirkin V., Dikic I.: Ubiquitin networks in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2011; 21: 21-28
- [30] Koshihara T.: Mitochondrial-mediated antiviral immunity. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1833: 225-232
- [31] Koshihara T., Bashiruddin N., Kawabata S.: Mitochondria and antiviral innate immunity. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, 2011; 2: 257-262
- [32] Krug A., Luker G.D., Barchet W., Leib D.A., Akira S., Colonna M.: Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood*, 2004; 103: 1433-1437
- [33] Lee J.Y., Zhao L., Hwang D.H.: Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids. *Nutr. Rev.*, 2010; 68: 38-61
- [34] Liu S.Y., Sanchez D.J., Cheng G.: New developments in the induction and antiviral effectors of type I interferon. *Curr. Opin. Immunol.*, 2011; 23: 57-64
- [35] Luise C., Capra M., Donzelli M., Mazzarol G., Jodice M.G., Nucciforo P., Viale G., Di Fiore P.P., Confalonieri S.: An atlas of altered expression of deubiquitinating enzymes in human cancer. *PLoS One*, 2011; 6: e15891
- [36] Lund J.M., Alexopoulou L., Sato A., Karow M., Adams N.C., Gale N.W., Iwasaki A., Flavell R.A.: Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 5598-5603
- [37] Maelfait J., Beyaert R.: Emerging role of ubiquitination in antiviral RIG-I signaling. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2012; 76: 33-45
- [38] Martinez-Forero I., Rouzaut A., Palazon A., Dubrot J., Melero I.: Lysine 63 polyubiquitination in immunotherapy and in cancer-promoting inflammation. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 6751-6757
- [39] Mattern M.R., Wu J., Nicholson B.: Ubiquitin-based anticancer therapy: carpet bombing with proteasome inhibitors vs surgical strikes with E1, E2, E3, or DUB inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1823: 2014-2021
- [40] Molineaux S.M.: Molecular pathways: targeting proteasomal protein degradation in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2012; 18: 15-20
- [41] Mukhopadhyay D., Riezman H.: Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, 2007; 315: 201-205
- [42] Niewold T.B.: Interferon alpha-induced lupus: proof of principle. *J. Clin. Rheumatol.*, 2008; 14: 131-132
- [43] Niewold T.B., Adler J.E., Glenn S.B., Lehman T.J., Harley J.B., Crow M.K.: Age- and sex-related patterns of serum interferon- $\alpha$  activity in lupus families. *Arthritis Rheum.*, 2008; 58: 2113-2119
- [44] Ning S., Campos A.D., Darnay B.G., Bentz G.L., Pagano J.S.: TRAF6 and the three C-terminal lysine sites on IRF7 are required for its ubiquitination-mediated activation by the tumor necrosis factor receptor family member latent membrane protein 1. *Mol. Cell. Biol.*, 2008; 28: 6536-6546
- [45] O'Neill L.A., Bryant C.E., Doyle S.L.: Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 2009; 61: 177-197
- [46] Paul S.: Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. *Bioessays*, 2008; 30: 1172-1184
- [47] Poock H., Ruland J.: From virus to inflammation: Mechanisms of RIG-I-induced IL-1 $\beta$  production. *Eur. J. Cell Biol.*, 2012; 91: 59-64
- [48] Ramos H.J., Gale M.Jr.: RIG-I like receptors and their signaling crosstalk in the regulation of antiviral immunity. *Curr. Opin. Virol.*, 2011; 1: 167-176
- [49] Rastogi N., Mishra D.P.: Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors. *Cell Div.*, 2012; 7: 26
- [50] Sadler A.J., Williams B.R.: Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008; 8: 559-568
- [51] Saitoh T., Tun-Kyi A., Ryo A., Yamamoto M., Finn G., Fujita T., Akira S., Yamamoto N., Lu K.P., Yamaoka S.: Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat. Immunol.*, 2006; 7: 598-605
- [52] Seth R.B., Sun L., Ea C.K., Chen Z.J.: Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF3. *Cell*, 2005; 122: 669-682
- [53] Sgarbanti M., Marsili G., Remoli A.L., Orsatti R., Battistini A.: IRF-7: new role in the regulation of genes involved in adaptive immunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007; 1095: 325-333
- [54] Tak P.P., Firestein G.S.: NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.*, 2001; 107: 7-11
- [55] Takeuchi O., Akira S.: Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.*, 2009; 227: 75-86
- [56] Takeuchi O., Akira S.: Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010; 140: 805-820
- [57] 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: 920-940
- [58] Tsou W.L., Sheedlo M.J., Morrow M.E., Blount J.R., McGregor K.M., Das C., Todi S.V.: Systematic analysis of the physiological importance of deubiquitinating enzymes. *PLoS One*, 2012; 7: e43112
- [59] Wang J., Maldonado M.A.: The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell. Mol. Immunol.*, 2006; 3: 255-261
- [60] Yuk J.M., Jo E.K.: Toll-like receptors and innate immunity. *J. Bacteriol. Virol.*, 2011; 41: 225-235
- [61] Zeng W., Xu M., Liu S., Sun L., Chen Z.J.: Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3. *Mol. Cell*, 2009; 36: 315-325

-----  
 Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.