MECHANIZMY MOLEKULARNE OBRONY USTROJU W CHOROBACH WIRUSOWYCH

MOLECULAR MECHANISMS OF DEFENSE OF BODY IN VIRAL DISEASES

Jan ŻEROMSKI[1], Mariusz KACZMAREK[1], Husam SAMARA[1], Grzegorz DWORACKI[1], Arleta KOWALA-PIASKOWSKA[2], Iwona MOZER-LISEWSKA[2]

[1]Katedra Immunologii Klinicznej i Katedra i [2]Klinika Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: W ostatnich kilkudziesięciu latach pojawiło się wiele „nowych" chorób o etiologii wirusowej, które stały się przyczyną milionów ofiar ludzkich na całym świecie. Oprócz HIV/AIDS są to infekcje spowodowane przez koronawirusy (SARS), wirusy Ebola i wiele innych. Ich patogeneza, zapobieganie i leczenie są wciąż dalekie od oczekiwań. Swoista odpowiedź immunologiczna wobec antygenów wirusowych jest często mało skuteczna, choćby ze względu na dużą zmienność wirusów. Stąd duże zainteresowanie budzą mechanizmy nieswoistej odporności a także czynniki molekularne ze względu na możliwość oceny bezpośrednich interakcji kwasów nukleinowych i białek wirusa z całym kompleksem substancji i przy udziale receptorów Toll-podobnych zlokalizowanych w endosomach, a także receptorów RIG-1-podobnych obecnych w cytosolu komórki. Prowadzi to do transkrypcji genów komórkowych, sekrecji RNA i wybranych cytokin prozapalnych. Mechanizm ten nie zawsze jest skuteczny. W wielu chorobach wirusowych dochodzi natomiast do powstawania w komórkach tzw. inflamasomów, kompleksów wielobiałkowych, które prowadzą do sekrecji cytokin o szerokim spektrum działania i mobilizacji zarówno odpowiedzi nieswoistej jak i swoistej. Tworzenie inflamasomów, ich funkcje, rola w różnych infekcjach wirusowych a także związane z nimi zagrożenia będą przedmiotem dalszej dyskusji.

Słowa kluczowe: receptory rozpoznające wzorce, inflamasom, cytokiny IL-1β, IL-18, kaspaza-1

Summary: In the last few decades the number of „novel" viral diseases has emerged, that resulted in a toll of several milions of human victims worldwide. Apart from HIV/AIDS they include coronaviruses (SARS), Ebola viral haemorragic fever and others. Their pathogenesis, prevention and treatment are far from the present-day expectations. Specific immune response against viral antigens is often not very efficient, partly because of viral variations due to mutations and environmental pressures. That's why the mechanisms of innate immunity and molecular factors are subject of current interest

nowadays, due to the possibility of direct interactions of viral nucleic acids and proteins with the whole biochemical armamentarium of cellular microenvironment. Viral RNA and DNA are sensed by Toll-like receptors localized in endosomes and by RIG-1 like receptors present in cytosol. This leads to the transcription of cellular genes, followed by the secretion of endogenous RNA and proinflammatory cytokines. This mechanism, however, is not always satisfactory. Instead, in a number of viral diseases takes place the formation of multiprotein complexes, so called inflammasomes, which lead to the secretion of broad spectrum cytokines, initiating both innate and acquired immunity. Inflammasome formation, their functions, the role in various viral infections, as well as the potential risks will be discussed.

Key words: interferons, pattern recognition receptors, inflammasomes

WSTĘP

CECHY SZCZEGÓLNE INWAZJI WIRUSOWYCH

W ciągu ostatnich 30-40 lat obserwujemy wzrost znaczenia patogenności chorób wywoływanych przez wirusy u ludzi. Nisze ekologiczne ograniczone do pewnych gatunków zwierząt zaczęły się otwierać i coraz więcej chorób występujących dotąd wyłącznie w królestwie fauny, pojawiło się u ludzi. Przykładów takich transferów biologicznych jest wiele, jak choćby wirus nabytego niedoboru odporności (HIV/AIDS), wirus Zachodniego Nilu, koronawirusy (SARS), wirus Ebola a ostatnio prawdopodobnie wirus MERS. Przyczyn takiego stanu rzeczy bliżej nie znamy, choć można się domyślać, że powodem są migracje ludności, penetracja przez naukowców i różnego rodzaju podróżników niedostępnych dotąd ekosystemów i inne. Tragiczne skutki takich infekcji, jakie obserwowano ostatnio, np. w przypadku gorączek krwotocznych, są pochodną braku odporności nabytej u zakażonych osobników i wymagają nowego spojrzenia i podejścia do tego problemu.

Jedną z ważnych cech infekcji wirusowych jest tempo inwazji. Obliczono, że liczba wirionów HIV może wzrastać w ciągu doby do wartości $10^{10\text{-}11}$ [13]. Ze względu na fakt, że wirusy są obligatoryjnymi pasożytami proliferującymi wyłącznie wewnątrzkomórkowo, wskazuje to, że mają ogromne zdolności przystosowawcze do obcego mikrośrodowiska zakażonej komórki. Infekcja komórek nie jest przypadkowa. Wirusy zwykle zakażają wybrane dla danego gatunku komórki docelowe, np. hepatocyty w infekcjach HBV i HCV. W wielu wypadkach nie powodują ich zniszczenia i dopiero swoisty odczyn ze strony układu odpornościowego gospodarza prowadzi do uszkodzenia i następnie apoptozy zainfekowanych komórek, jak ma to miejsce we wspomnianych wirusowych zapaleniach wątroby. Swoista odpowiedź immunologiczna w infekcjach wirusowych jest jednak skuteczna tylko częściowo i to zwykle późno, w przewlekłych stadiach choroby, co praktycznie wyklucza całkowitą eliminację wirusów z ustroju. Ponadto stała zmienność genotypowa i fenotypowa większo-

ści wirusów pod presją środowiska zmniejsza w istotny sposób skuteczność działania tej odporności. Pozwala to przypuszczać, że możliwości wczesnej eradykacji wirusów z organizmu należy raczej szukać na poziomie odporności wrodzonej czy wręcz mechanizmów molekularnych.

ROLA INTERFERONÓW W OBRONIE PRZECIWWIRUSOWEJ

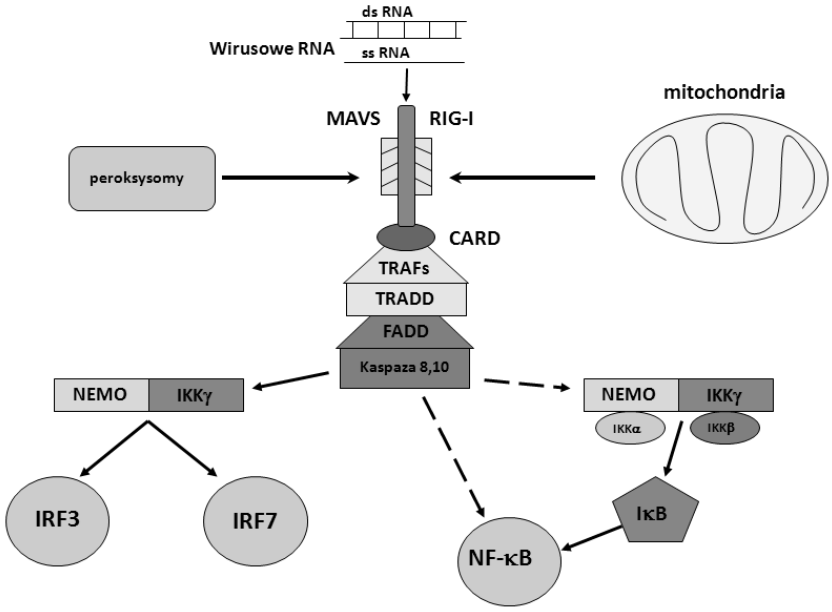
Obecnie rozróżnia się 3 typy interferonów (IFN) – typ I, typ II i typ III. Działanie przeciwwirusowe mają IFN typu I i III, natomiast typ II przejawia głównie efekt immunoregulacyjny. Nie ulega dzisiaj wątpliwości, że rodzina IFN typu I, a zwłaszcza IFN-alfa (α) i IFN-beta (β) mają kluczowe znaczenie w degradacji wirusowego zarówno ssRNA jak i dsRNA. Kluczową rolę w rozpoznawaniu wirusowych kwasów nukleinowych odgrywają tzw. receptory rozpoznające wzorce (ang. *Pattern Recognition Receptors,* PRR). Są to molekuły obecne zarówno na powierzchni jak i wewnątrz komórek, rozpoznające struktury związane z patogenami a nieobecne w organizmach wyższych, jak kwasy nukleinowe, złożone lipidy peptydoglikany, lipopolisacharydy i inne. Są to tzw. PAMP (ang. *Pathogen Associated Molecular Patterns*), ważne dla rozwoju i przeżycia tych mikroorganizmów. Najlepiej poznaną rodziną PRR są receptory Toll-podobne (TLR). Wirusowe RNA są rozpoznawane przez obecne w endosomach komórki TLR3, TLR7 i TLR8. Ponadto istnieje rodzina PRR obecna w cytosolu komórki określana jako RLR (ang. *RIG-Like Receptors*), obejmująca receptory RIG-1, MDA-5 i LGP2 [18]. Identyfikacja wirusowego RNA przez TLR obecne w endosomach uruchamia wewnątrzkomórkowy, cytoplazmatyczny, złożony szlak sygnałowy, którego celem jest synteza endogennego IFN typu I. Biorą w nim udział różne molekuły w zależności od rodzaju TLR. Dla przykładu, w przypadku TLR7 i 8 proces zaczyna się od aktywacji białka adaptorowego MyD88, następnie kinaz białkowych związanych z receptorem dla interleukiny-1 (IRAK), czynników związanych z receptorem dla TNF (TRAF), czynników regulujących interferon (IRF). Te ostatnie wnikają do jądra komórki i wiążą się do sekwencji jądrowego DNA zwanej ISRE (ang. *IFN-Stimulated Response Element*), co indukuje etap transkrypcji mRNA dla IFN [18, 42]. O znaczeniu czynników regulujących interferon (IRF) świadczy opublikowany niedawno przypadek ciężkiego przebiegu grypy u dziecka, u którego wykryto mutację genu kodującego IRF7. Leukocyty, plazmocytoidalne komórki dendrytyczne a także fibroblasty skóry produkowały znikome ilości IFN-α i wykazywały wzmożoną replikację wirusa grypy [5].

IFN-α produkowane są głównie przez leukocyty, zwłaszcza przez plazmocytoidalne komórki dendrytyczne (pDC). Natomiast IFN-β może być wytworzony przez niemal każdą komórkę w następstwie rozpoznania patogenu przez wewnątrzkomórkowe PAMP i aktywacji czynników transkrypcyjnych IRF3 i NF-B. Powstały endogenny IFN wydzielony na zewnątrz komórki reaguje z receptorami dla IFN, hete-

rodimerycznym kompleksem złożonym z łańcuchów IFNAR1 i IFNAR2 obecnym na wszystkich komórkach jądrzastych człowieka. Łańcuchy te różnią się powinowactwem dla IFN. IFNAR1 ma niskie powinowactwo, podczas gdy IFNAR2 – wysokie. Związanie IFN z kompleksem IFNAR inicjuje szlak sygnałowy JAK-STAT prowadzący do aktywacji tyrozynowych kinaz białkowych, czego końcowym efektem jest aktywność transkrypcyjna wybranych genów [43, 45].

Poza INF-α istnieją podtypy IFN typu I znamienne dla różnych lokalizacji. IFN-κ jest produkowany przez keratynocyty. IFN-epsilon(ε) jest związany z układem moczowo-płciowym i z odpornością błon śluzowych. Jego sygnałowanie ma charakter stały, niezależny od infekcji, zmienia się w zależności od fazy cyklu miesiączkowego i ma miejsce między innymi w ciąży [14, 56].

Natomiast IFN typu III, a właściwie ich rodzina składająca się z co najmniej 4 białek, znana jest pod różnymi nazwami jak IFN-lambda (λ), IFNL, IL-28A, IL-28B, IL-29. Ma ona szczególnie istotną rolę ochronną wobec struktur nabłonkowych w infekcjach kanałów naturalnych jak przewód pokarmowy w biegunkach rotawirusowych czy drogi oddechowe w grypie. Aktywność IFN typu III jest w dużym stopniu uzależniona od lokalizacji tkankowej jego receptorów, składających się z 2 podjednostek, IL-28RA i IL-10 RB. Ich połączenie (dimeryzacja) warunkuje uruchomienie transdukcji sygnału szlakiem JAK-STAT, podobnie, jak ma to miejsce w przypadku receptorów IFNAR IFN typu I [11, 35].



RYCINA 1. Szlaki sygnałowania RIG-1/MAVS w infekcjach wirusowych. Według [33] zmodyfik.
FIGURE 1. RIG-1/MAVS signaling pathway in viral infections. Acc.to [33] modif.

Drugą rodziną PRR reagującą z wirusowymi RNA są RLR. Należą do nich RIG-1 (ang. *Retinoic acid Inducible Gene 1*), MDA5 (ang. *Melanoma Differentiation-Associated Protein 5*) i LGP2 (ang. *Laboratory of Genetics and Physiology 2*).

W przypadku rozpoznania wirusowego RNA przez receptory RIG-1 podobne (RLR), te ostatnie wiążą się ze specjalnym białkiem pochodzącym z mitochondriów tzw. MAVS (ang. *Mitochondrial Antiviral signaling*), mającym kilka ważnych domen, w tym CARD. Interakcja CARD MAVS z CARD RIG-1 aktywuje szlak sygnałowy złożony z kilkunastu molekuł, którego końcowym efektem jest synteza IFN-β. Wymagana jest aktywacja 2 czynników transkrypcyjnych IRF3 i IRF7 (ang. *Interferon Regulating Factors*) i NF-κB (ryc. 1) [33].

Oprócz wirusów RNA indukujących silną aktywację PRR, istnieje szereg wirusów, w których ta aktywacja jest słaba i następowa produkcja IFN niska. Należą tu ważne wirusy w patologii człowieka jak HIV-1, HBV, HCV czy HPV-16. Za mechanizm tej inhibicji aktywacji odpowiedzialne są białka prawdopodobnie indukowane przez wirusy, które wykryto w plazmocytoidalnych komórkach dendrytycznych (pDC), głównych miejscach syntezy IFN typu I. Przykładami tych białek mogą być ILT7 (ang. *Immunoglobulin-Like Transcript 7*), BST2 (ang. *Bone marrow Stromal cell antygen 2*) zwany również teteryną, DCIR (DC-immunoreceptor). Mechanizmy ich działania są różne i dotyczą rozmaitych organelli komórkowych, jak mikrotubule czy cytoskeleton [19]. Podejmowane są co prawda próby tworzenia *in vitro* chimerycznych konstruktów białkowych zdolnych do produkcji IFN, ale badania te są jeszcze dalekie do zastosowania w klinice [37].

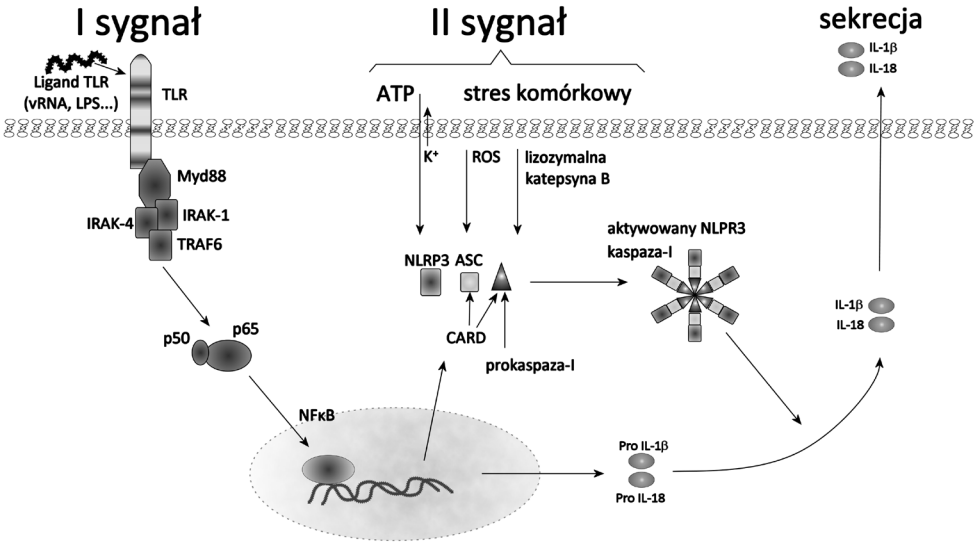
Stąd duże zainteresowanie wzbudził trzeci mechanizm nieswoistej obrony przeciwwirusowej, czyli powstawanie i aktywacja inflamasomów.

POJĘCIE I BUDOWA INFLAMASOMU

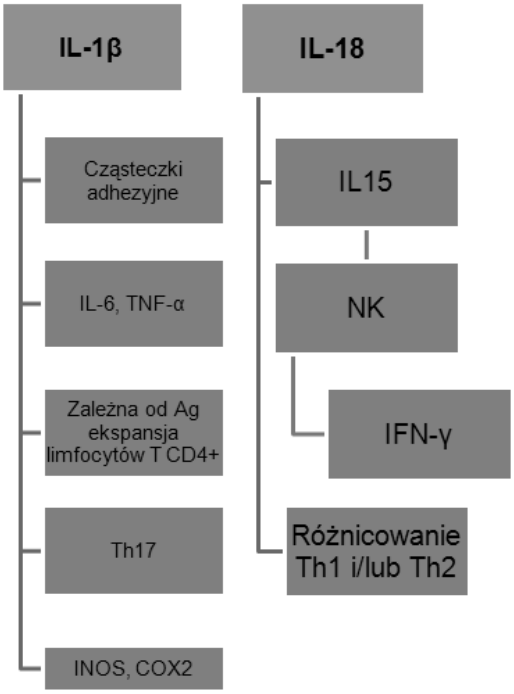
Inflamasomy są to kompleksy wielobiałkowe powstające wewnątrz komórek, zwykle w cytosolu, mające zdolność wykrywania wzorów molekularnych związanych z mikrobami (ang. *Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMP), takich jak np. genomowe kwasy nukleinowe wirusów [27, 31, 41]. Reagują także na stres komórkowy wywołany przez takie czynniki jak rodniki tlenowe, uwolnione enzymy lizozomalne, sole kwasu moczowego, krzemionka i inne, określane wspólnym mianem DAMP (ang. *Danger Associated Molecular Patterns*). Ich powstanie i struktura są ściśle powiązane z aktywnością receptorów rozpoznających wzorce (ang. *Pattern Recognition Receptors*, PRR), zwłaszcza receptorów NOD-podobnych (ang. *Nucleotide oligomerization domain*, NLR). NLR są bardzo starą filogenetycznie rodziną receptorów obecną nie tylko w królestwie zwierząt ale także u roślin [8]. Występują wewnątrz komórek, głównie w cytosolu. Pełnią ważną rolę ochronną, chroniąc przed szerokim wachlarzem bakterii i grzybów [22].

Ogólnie mówiąc, mechanizm działania inflamasomów składa się z kilku etapów. W pierwszym aktywacja danego TLR wywołana rozpoznaniem jakiejś struktury patogenu indukuje w komórce transkrypcję i translację molekuł NOD-podobnych a także procytokin,interleukiny 1β (IL-1β) i interleukiny 18 (IL-18). Następnie do powstałych molekuł NOD podobnych przyłącza się cząsteczka adaptorowa ASC (ang. *Apoptosis-associated Speck-like protein*). Jej zaletą jest posiadanie molekuły CARD (ang. *Caspase Activation and Recruitment Domain*), dzięki czemu może ona związać proenzym kaspazę-1 i następnie aktywować go do czynnej postaci (ryc. 2). Kaspaza-1 ostatecznie aktywuje obie procytokiny, które są następnie uwalniane z komórki.

Powstanie i obecność w zakażonym ustroju obu tych cytokin zmienia istotnie reaktywność układu immunologicznego, zarówno odporności wrodzonej jak i nabytej. IL-1β indukuje powstanie i ekspresję szeregu innych cytokin prozapalnych (IL-6, TNF, IL-17) a także różnych mediatorów zapalenia, jak choćby indukowalnej syntazy tlenku azotu (INOS) i cząsteczek adhezyjnych. Natomiast IL-18 aktywuje komórki NK do produkcji IFN-γ i nasila ich cytotoksyczność. Wyzwala także różnicowanie limfocytów T helper do 2 subpopulacji Th1 i Th2 w kooperacji z innymi cytokinami (IL-12 lub IL-2), co indukuje odporność nabytą [20]. Zakres aktywności obu omawianych cytokin pokazano na ryc. 3. Nasilony stan zapalny wywołany przez aktywację inflamasomów może jednak prowadzić do śmierci komórki. Taki rodzaj śmierci określa się mianem **pyroptozy** [32].



RYCINA 2. Powstawanie inflamasomu wewnątrz komórki – schemat
FIGURE 2. Formation of inflammasome inside cell – a scheme



RYCINA 3 Zakres aktywności cytokin IL-1β i IL-18. Wg [39]
FIGURE 3. The range of IL-1 and IL-18 activity. Acc. [39]

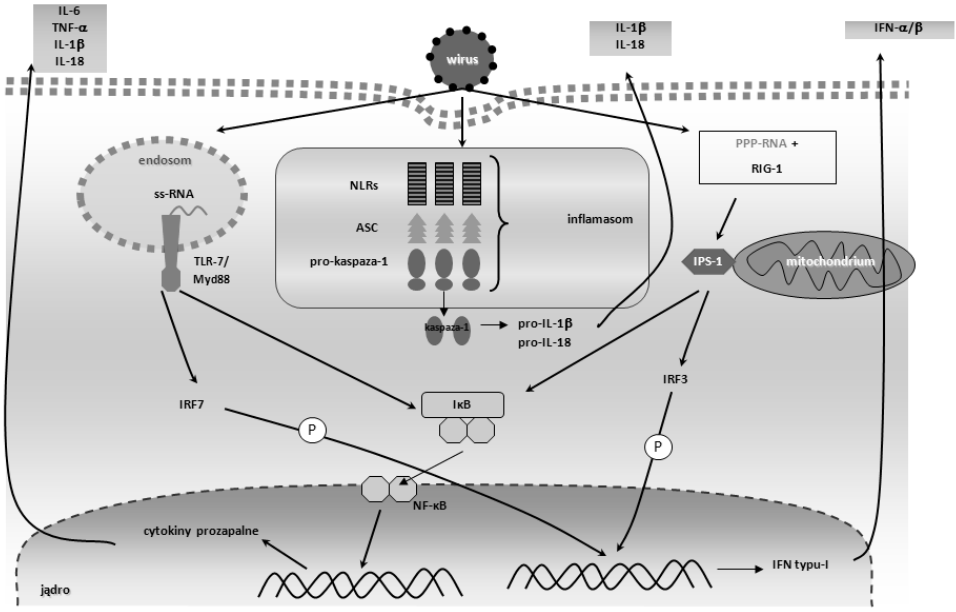
Receptory NLR stanowią dużą grupę (n=22) wewnątrzkomórkowych sensorów PAMP [2]. Zawierają co najmniej 2-3 domeny: NACHT, zdolną do wiązania nukleotydów i obecną we wszystkich NLR, C-końcową LRR (ang. *Leucine-Rich Repeat*) rozpoznającą ligandy oraz domenę N-końcową złożoną z domeny CARD, domeny pyriny (PYD), te dwie ostatnie określane są często jako PYCARD. Mają one kluczowe znaczenie w wiązaniu cząsteczki ASC. Część NLR ma inną domenę N-końcową pełniącą podobną funkcję, tzw. BIR (ang. *Baculovirus Inhibitor Repeats*). Tylko podrodzina NALP (NLRP1-14) posiadająca domenę PYD i podrodzina IPAF posiadająca domenę CARD lub BIR, są zdolne do tworzenia inflamasomów ze względu na możność wiązania ASC. Wyjątkiem jest inflamasom NLRC4, który nie ma domeny pyriny, ale może bezpośrednio rekrutować kaspazę-1 przez domenę CARD [34].

Oprócz NLR, również inne białka PRR mogą tworzyć inflamasomy. Należy to rodzina PYHIN, z której wywodzi się inflamasom AIM2, zawierający molekułę PYD N-końcową i domenę HIN 200. Z tej samej rodziny wywodzi się inflamasom IF116. Oba wyżej wymienione wykrywają wirusowe DNA [48]. Jeszcze innym jest RIG-1 z rodziny receptorów RLR. Ciekawe, że wszystkie te inflamasomy wią-

żą cząsteczkę ASC, indukują kaspazę-1 i prowadzą do sekrecji IL-1β i IL-18 [23]. Wskazuje to na wspólny mechanizm ich indukcji bez względu na pochodzenie.

Najlepiej poznanym jest jednak inflamasom z rodziny NLR, NLRP3. U człowieka opisano jego występowanie w różnych komórkach ustroju jak leukocyty krwi obwodowej, zarówno monocyty jak i granulocyty, komórki dendrytyczne, komórki mikrogleju a nawet komórki gwiaździste wątroby [54].

Szereg wirusów, zarówno RNA jak i DNA aktywuje NLRP3. Można tu wymienić paramyxo-wirusy (RSV, wirus odry), ortomyxowirusy (np. wirus grypy--influenza A virus- IAV) a także niektóre wirusy herpes. Wg Lupfera i wsp. [30] wykazano już aktywację NLRP3 przez co najmniej 15 różnych wirusów patogennych. Aktywacja ta nie jest jednak bezpośrednia, bo receptory NLR nie mają zdolności prostej interakcji z wirusowym RNA (vRNA). Przyjmuje się, że istnieją 2 pośrednie drogi aktywacji NLRP3. W pierwszej vRNA jest rozpoznawany przez receptory Toll-podobne lub RIG-1 podobne, które aktywując NF-κB powodują transkrypcję procytokin (IL-1β, IL-18) i NLRP3. To indukuje aktywację NLRP3 [20, 40]. W drugiej, czynnikiem aktywującym ma być kinaza PKR (ang. *double-stranded RNA-dependent Protein Kinase*), która ma zdolność bezpośredniego wiązania vRNA, co zapobiega replikacji wirusa. Mechanizm tej aktywacji

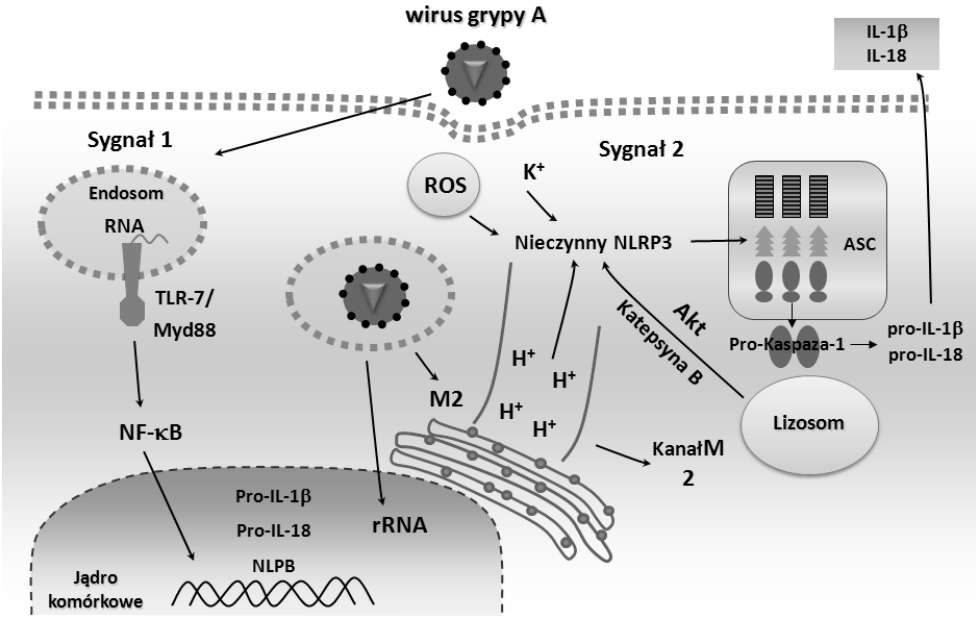


RYCINA 4. Indukcja inflamasomu NLRP3 w następstwie infekcji wirusem grypy A – sygnał I. Wg [39] zmodyfik.

FIGURE 4. NLRP3 inflammasome induction following IAV (influenza A) infection – signal I. Acc. [39] modif.

pozostaje jednak bliżej nieznany [9, 28]. Ponadto, aktywacja NLRP3 nie zawsze jest ograniczona do jednego inflamasomu. Wirus EMCV (encephalomyocarditis) wykorzystuje do tworzenia inflamasomu receptory RLR, MDA5, jednak dla uzyskania aktywacji tego inflamasomu, konieczna okazała się czynność NLRP3 [40].

W przypadku wirusa grypy (IAV) proces powstawania inflamasomu NLRP3 w komórkach nabłonka oddechowego pęcherzyków płucnych wymaga 2 sygnałów, obu dostarczonych przez wirus. Pierwszym jest pobudzenie TLR przez wirusowy genomowy RNA prowadzące do aktywacji transkrypcyjnej genów kodujących pro-IL-1β, IL-18 oraz NLRP3 (ryc. 4). Drugi sygnał jest następstwem stresu związanego z uwolnieniem różnych substancji jak rodniki tlenowe (ROS), lizosomalna katepsyna, jony potasu (K+) z kanału jonowego opłaszczonego ATP [39]. Według [21] wirus grypy, wydostając się z endosomu o kwaśnym pH, wytwarza białko M2, które zmienia pH mikrośrodowiska z kwaśnego na obojętne i które tworzy kanał jonowy transportujący protony (H+), które wraz z uwolnionymi jonami K+, ROS, katepsyną B z lizosomów prowadzą do ostatecznej aktywacji inflamasomu (ryc. 5). W doświadczeniach na myszach zakażonych wirusem grypy A wykazano, że powstawanie inflamasomów znacznie zmniejsza śmiertelność zwierząt, zwiększa napływ komórek zapalnych do zajętych płuc poprzez aktywację chemokin a także indukuje procesy naprawcze w utkaniu płuc [50].



RYCINA 5. Indukcja NLRP3 w następstwie infekcji wirusem grypy A – sygnał II. Wg [39] zmodyfik.
FIGURE 5. NLRP3 induction following IAV infection – signal II./ Acc. [39] modif.

Opisano kilka innych inflamasomów z rodziny NLR, ale wiadomo o nich jeszcze stosunkowo niewiele. NLRP1 inflamasom, łącząc się z kaspazami -2 i -9 tworzy tzw. apoptosom prowadzący do śmierci komórki [4]. NLRP6 występuje w znacznych ilościach w środowisku jelit. Utrzymuje równowagę flory bakteryjnej. Brak tego inflamasomu prowadzi do zapalenia jelita grubego, hiperplazji błony śluzowej a nawet do proliferacji nowotworowej. Stąd uważa się, że ma on kluczowe znaczenie w zapobieganiu nowotworzenia w jelitach [12]

HAMOWANIE FUNKCJI INFLAMASOMÓW PRZEZ WIRUSY

Presja ewolucyjna spowodowała wytworzenie przez wiele wirusów białek i/lub enzymów degradujących lub hamujących inflamasomy lub ich składowe. Wirus HSV-1 wykazuje ekspresję ligazy ubikwityny E3 (ICP0), która degraduje inflamasom IFI16 [38].

Wirus krowianki (cowpox) wytwarza białko serpinę (CrmA), które blokuje proenzym kaspazę-1 [44]. Natomiast wirus ospy koduje domenę pyriny, która wiąże cząsteczkę ASC-1 blokując tym samym aktywację inflamasomu [25]. Infekcja wirusem Herpes-1 (HSP-1) początkowo prowadzi do aktywacji inflamasomów IFI16 i NLRP3, jednak później dochodzi do ich inhibicji [24, 38]. Wirus Kaposiego (KSHV) koduje białko Orf63, które hamuje aktywację NLRP1- i NLRP3-zależnej kaspazy-1 i związane z tym dojrzewanie czynnościowe IL-1β i IL-18 [15]. Białko NS1 wirusa IAV (grypy A) szczepu H1N1 zawiera domenę wiążącą RNA, która hamuje aktywację obu cytokin IL-1β i IL-18 [49].

Podobne mechanizmy unikania aktywacji inflamasomów opisano w infekcjach bakteryjnych [51]. Ponadto, istnieją własne mechanizmy ustrojowe hamujące skutki nadmiernej aktywacji inflamasomu. Należą tu antagonista receptora IL-1 (IL-1Ra), który współzawodniczy o receptory IL-1 (IL-1RI i IL-1RII), stymulacja ligandów z rodziny TNF a także autofagia [piśm. wg 34].

Jak się przekonamy w dalszej części pracy, powstanie i aktywacja inflamasomów mogą być jednak szkodliwe i niebezpieczne dla ustroju, zwłaszcza w przebiegu niektórych chorób wirusowych.

ROLA INFLAMASOMÓW W WYBRANYCH JEDNOSTKACH CHOROBOWYCH O ETIOLOGII WIRUSOWEJ

We wczesnym okresie HIV/AIDS wirus indukuje pierwszy sygnał dla powstania inflamasomu NLRP3 w makrofagach, co skutkuje powstawaniem IL-1β. Nie jest jednak w stanie dostarczyć drugiego sygnału, co powoduje brak IL-18 i sprzyja progresji infekcji. Indukcja pro-IL-1 wymaga rozpoznania HIV-1 RNA przez receptor Toll-podobny 8 (TLR8) [17]. W przypadku inwazji HIV do ośrod-

kowego układu nerwowego (OUN) dochodzi do szybkiej aktywacji NLRP3 w komórkach mikrogleju, co z jednej strony może zahamować inwazję ale także może prowadzić do zapalenia mózgu [47, 52].

W wirusowym zapaleniu wątroby typu C miejscem powstawania inflamasomów są monocyty krwi, komórki mieloidalne szpiku i makrofagi wątrobowe (komórki Kuppfera) [3]. Rola inflamasomu w monocytach wydaje się być korzystna, gdyż przez sekrecję IL-18 zwiększa się efekt antywirusowy komórek NK poprzez produkcję IFN-γ. [1, 46].Natomiast wewnątrzwątrobowa produkcja IL-1 w makrofagach indukowana przez NLRP3 jest uważana za główny czynnik odpowiedzialny za stan zapalny wątroby i progresję choroby [36].

W wirusowym zapaleniu mięśnia sercowego wywołanego przez wirus coxsackie B3 (CVB3) stwierdzono zależność pomiędzy aktywacją inflamasomu NLRP3 a nasileniem objawów chorobowych. Zahamowanie jego aktywacji obniżało aktywność enzymów takich jak kinaza keratynowa w surowicy, zmniejszało uszkodzenie mięśnia sercowego, zmniejszało spadek wagi. Wydaje się, że negatywna rola w patogenezie zapalenia mięśnia sercowego wywołanego wirusem coxsackie jest bezsporna [53].

W zapaleniu mózgu wywołanym przez wirus Zachodniego Nilu (WNV) wykazano na materiale doświadczalnym myszy, pośrednio pozytywną rolę inflamasomu. Okazało się bowiem, że myszy ASC (-/-) były bardziej podatne na zakażenie WNV i miały krótszy okres przeżycia w porównaniu z myszami normalnymi. Jak wiadomo, molekuła ASC ma kluczowe znaczenie w powstaniu kompleksu inflamasomu, aktywacji kaspazy-1 i produkcji cytokin IL-1β i IL-18 [26]. Wcześniej inni autorzy wykazali znaczenie IL-1β w ograniczaniu rozwoju infekcji WNV w ośrodkowym, układzie nerwowym nie tylko u myszy ale i u ludzi [43].

Mało znana w Polsce zoonoza Chikungunya jest chorobą wirusową przenoszoną przez komary. Wywoływana jest przez alfawirusy należące do rodziny *Togaviridae*. U ludzi infekcja powoduje wysoką gorączkę, wysypkę, bóle stawów kończyn, niekiedy wybroczyny i wylewy podskórne. Choroba zwykle kończy się wyzdrowieniem, ale niebezpieczne są powikłania, zwłaszcza zapalenie mózgu [7]. W badaniach fibroblastów skórnych zakażonych omawianym wirusem wykazano rolę inflamasomu AIM2. Inhibicja tego inflamasomu przy użyciu siRNA poprzez inaktywację kaspazy-1 powodowała nasilenie replikacji wirusa. Podobne badania ale z innym wirusem (WNV) dały analogiczne wyniki [10]. Sugeruje to pozytywną rolę inflamasomu AIM2 w obu wspomnianych wyżej infekcjach wirusowych.

WNIOSKI I PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

Nie ulega dzisiaj wątpliwości, że odporność wrodzona odgrywa bardzo ważną rolę w obronie przeciwwirusowej. W pierwszym rzędzie należy tu wymienić receptory rozpoznające wzorce (PRR), takie jak rodzina receptorów Toll-podobnych

(TLR) i RIG-1 podobnych RLR, których głównym celem ataku są kwasy nukleinowe wirusów, głównie RNA. Wykrycie w zakażonej komórce złożonych kompleksów wielobiałkowych, czyli inflamasomów stało się nowym narzędziem nieswoistej obrony przeciwwirusowej. W wielu chorobach wirusowych powstawanie i aktywacja inflamasomów odgrywa rolę pozytywną, przyczyniając się do ograniczenia infekcji i indukcji odpowiedzi swoistej. Przykładem może być tu grypa A, czy zapalenie mózgu spowodowane przez wirusa Zachodniego Nilu. W szeregu innych ma niestety efekt negatywny, prowadząc do nasilenia stanu zapalnego i uszkodzenia tkanek, jak to ma miejsce choćby w HIV/AIDS i w wirusowym zapaleniu wątroby typu C. Stąd, w wielu ośrodkach naukowych trwają obecnie badania, których celem jest albo ograniczenie aktywności cytokin będących skutkiem aktywacji inflamasomu, lub zapobieganie jego aktywacji. W pierwszym przypadku są to czynniki antagonistyczne wobec IL-1β i IL-18. Przykładami są tu anakinra, nie-glikolizowany rekombinowany antagonista receptora (IL-1Ra), rilonacept – fuzyjna glikoproteina działająca jako rozpuszczalny receptor – przynęta (ang. *decoy*) dla IL-1α i IL-1β, neutralizujące przeciwciało przeciw IL-1β (kanakinumab), przeciw IL-18 i jej receptorowi i inne [16]. Znane są także nowo zsyntetyzowane związki chemiczne hamujące wybiórczo aktywację inflamasomu NLRP3 jak np. BHB (β-hydroksymaślan) [58], czy MCC950 [6]. Ich znaczenie kliniczne wymaga jednak dalszych badań, zarówno doświadczalnych jak i u pacjentów. Ponadto, dogłębne poznanie struktury i interakcji składowych inflamasomów może mieć znaczenie dla projektowania nowych szczepionek antywirusowych [57].

PODZIĘKOWANIA

Artykuł finansowany z działalności statutowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

LITERATURA

[1] Burdette D, Haskett A, Presser L i wsp. Hepatitis C virus activates interleukin-1β via caspase-1-inflammasome complex. J Gen Virol 2012; **93**: 235-246.

[2] Chen G, Shaw MH, Kim YG i wsp. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. Annu Rev Pathol 2009; **4**: 365-398.

[3] Chen W, Xu Y, Li H i wsp. HCV genomic RNA activates the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells PLoS One 2014, **9**: e84953.

[4] Chu ZL, Pio F, Xie Z i wsp. A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. J Biol Chem 2001; **276**: 9239-9245

[5] Ciancanelli MJ, Huang SX, Luthra P i wsp. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. Science 2015; **348**: 448-453.

[6] Coll RC, Robertson AA, Chae JJ i wsp. A small molecule inhibitor of NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. Nat Med. 2015; **21**: 248-255.
[7] Czyrznikowska A, Dębiński W, Knap J i wsp. Chikungunya – „nowa" zoonoza w Europie. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze. Red. J. Cianciara i J. Juszczyk, wyd. Czelej, Lublin 2012, str. 568-573.
[8] Dangl JL, Jones JD. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. Nature 2001; **411**: 826-833.
[9] Dar AC, Dever TE, Sicheri F. Higher order substrate recognition of elF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. Cell 2005; **122**: 887-900.
[10] Ekchariyawat P, Hamel R, Bernard E i wsp. Inflammasome signaling pathways exert against Chikungunya virus in human dermal fibroblasts. Infect Genet Evol 2015; **32**: 401-408.
[11] Egli A, Santer DM, O'shea D i wsp. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. Emerg Microbes Infect 2014; **3**: e51
[12] Elinav E, Strowig T, Kau AL i wsp. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. Cell 2011; **145**: 745-757.
[13] Fauci AS, Lane HC. Zakażenie ludzkim wirusem upośledzenia odporności – AIDS i choroby pokrewne. W: Harrison Choroby Zakaźne. Red. DL Kasper, AS Fauci. Tłum. pol. Red. R Flisiak, Wyd. Czelej, Lublin 2012, str. 1068-1192.
[14] Fung KY, Mangan NE, Cumming H i wsp. Interferon-ε protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection. Science 2013; **339**: 1088-1092
[15] Gregory SM, Davis BK, West JA i wsp. Discovery of a viral NLR homolog that inhibits the inflammasome. Science 2011; **331**: 331-334.
[16] Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. Nat Medicine 2015; **21**: 677-687.
[17] Hernandez JC, Latz E, Urcuqui-Inchima S. HIV-1 induces the first signal to activate the NLRP3 inflammasome in monocyte-derived macrophages. Intervirology 2014; **57:** 36-42.
[18] Hoffmann H-H, Schneider WM, Rice CHM. Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. Trends Immunol 2015; **36:** 124-138.
[19] Hirsch I, Caux CH, Hasan U i wsp. Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: from chronic viral infections to cancer. Trends Immunol 2010; 31: 391-397.
[20] Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y i wsp. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. J Exp Med. 2009; **206**: 79-87.
[21] Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. Nat Immunol 2010; **11**: 404-410.
[22] Inohara N, Nunez G. The NOD: a signaling molecule that regulates apoptosis and host defense against pathogens. Oncogene 2001; **20**: 6473-6481.
[23] Jacobs SR, Damania B. NLRs, inflammasomes, and viral infection. J Leukoc Biol 2012; **92**: 469-477.
[24] Johnson KE, Chikoti L, Chandran B. Herpes simplex virus 1 infection induces activation and subsequent inhibition of the IFI16 and NLRP3 inflammasomes. J Virol 2012, **87**: 5005-5018.
[25] Johnston JB, Barrett JW, Nazarian SH i wsp. A pox virus encoded pyrin domain interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. Immunity 2005; **23**: 587-598.
[26] Kumar M, Roe K, Orillo B i wsp. Inflammasome adaptor protein Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) is critical for the immune response and survival in west Nile virus encephalitis. J Virol 2013; **87**: 3655-3667.
[27] Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. Immunol Rev 2009; **227**: 95-105.
[28] Lu B, Nakamura T, Inouve K i wsp. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. Nature 2012; **488**: 670-674.
[29] Loo YM, Gale M jr. Immune signaling by RIG-1-like receptors. Immunity 2011; **34**: 680-692.
[30] Lupfer CH, Kanneganti T-D. The expanding role of NLRs in antiviral immunity. Immunol Rev 2013; **255:** 13-24.

[31] Lupfer CH, Malik A, Kanneganti T-D. Inflammasome control of viral infection. Curr Op Virolog 2015; **12**: 38-46.
[32] Malireddi RK, Ippagunta S, Lamkanfi M, Kanneganti TD. Cutting edge: proteolytic inactivation of poly (ADP-ribose) polymerase 1 by the Nlrp3 and Nlrc4 inflammasomes. J Immunol 2010; **185**: 3127-3130.
[33] Matsumiya T, Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Antiviral signaling through retinoic acid-inducible gene-I-like receptors. Arch Immunol Ther Exp 2011; **59**: 41-48.
[34] Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. Clin Exp Immunol 2011; **166**: 1-15.
[35] Miknis ZJ, Magracheva E, Li W i wsp. Cristal structure of human interferon – lambda 1 in complex with its high affinity receptor interferon – lambda R1. J Mol Biol 2010; **404**: 650-664.
[36] Negash AA, Ramos HJ, Crochet N i wsp. IL-1β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. PLoS Pathog 2013; **9**: e1003330.
[37] Nistal-Villan E, Rodriguez-Garcia E, di Scala M i wsp. A RIG-1 2 CARD-MAVS200 chimeric protein reconstitutes IFN-β induction and antiviral response in models deficient in type I IFN response. J Innate Immun 2015; **7**: 466-471.
[38] Orzalli M, Deluca N, Knipe D. HSV-1 ICPO redistributes the nuclear IFI16 pathogen sensor and promotes its degradation. Proc Natl Acad Sci USA 2012; **109**: E3008-17
[39] Pang IK, Iwasaki A. Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus. Trends Immunol 2011; **32**: 34-41.
[40] Poeck H, Bscheider M, Gross O i wsp. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. Nat Immunol 2010; **11**: 63-69.
[41] Pothlichet J, Meunier I, Davis BK i wsp. Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells. PLoS Pathog 2013; **9**: e1003256.
[42] Porritt RA, Hertzog PJ. Dynamic control of type I IFN signalling by an integrated network of negative regulators. Trends Immunol 2015, **36**: 150-160.
[43] Ramos HJ, Lanteri MC, Blahnik G i wsp. IL-1β signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection PLoS Pathog 2012; **8**: e1003039.
[44] Ray CA, Black RA, Kronheim SR i wsp. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1β converting enzyme. Cell 1992; **69**: 597-604.
[45] Schreiber G, Piehler J. The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. Trends Immunol 2015; **36**: 139-149.
[46] Serti E, Werner JM, Chattergoon M i wsp. Monocytes activate natural killer cells via inflammasome-induced interleukin 18 in response to hepatitis C virus replication. Gastroenterology 2014; **147**: 209-220.
[47] Shi E, Yang L, Kouadir M i wsp. The NALP3 inflammasome is involved in neurotoxic prion peptide-induced microglial activation. J Neuroinflammation 2012; **9**: 73-84.
[48] Singh W, Kerur N, Bottero V i wsp. Kaposi's sarcoma-associated herpes virus latency in endothelial and B cells activates gamma interferon-inducible protein 16-mediated inflammasomes. J Virol 2013; **87**: 4417-4431.
[49] Stasakova J, Ferko B, Kittel C i wsp. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resultiong in fast apoptosis and release of high levels of interleukin 1β and 18, J Gen Virol 2005; **86**: 185-195.
[50] Thomas PG, Dash P, Aldridge JR jr i wsp. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1, Immunity 2009; **30**: 566-575.
[51] Ulland TK, Ferguson PJ, Sutterwala FS. Evasion of inflammasome activation by microbial pathogens. J Clin Invest 2015; **125**: 469-477.
[52] Walsh JG, Reinke SN, Power CH. Rapid inflammasome activation in microglia contributes to brain disease in HIV/AIDS. Retrovirology 2014; **11**: 35

[53] Wang Y, Gao B, Xiong S. Involvement of NLRP3 inflammasome in CVB3-induced viral myocarditis. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2014; **307**: 1438-1447.
[54] Watanabe A, Sohail MA, Gomes DA i wsp. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2009; **296**: G1248-G1257.
[55] Wen H, Miao Ea, Ting J P-Y. New mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. Immunity 2013; **39**: 432-441.
[56] Xi Y, Day SL, Jackson RJ, Ranasinghe C. Role of novel type I interferon epsilon in viral infection and mucosal immunity. Mucosal Immunol 2012; **5**: 610-622.
[57] Yamazaki T, Ichinohe T. Inflammasomes in antiviral immunity: clues for influenza vaccine development. Clin Exp Vaccine Res 2014; **3**: 5-11.
[58] Youm YH, Nguyen KY, Grant RW i wsp. The ketone metabolite β-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. Nat Med. 2015; **21**: 263-269.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 15.09.2015
Przyjęto: 29.09.2015
Jan Żeromski
Katedra Immunologii Klinicznej UM
ul. Rokietnicka 5D, 60-806 Poznań
email:jzeromski@ump.edu.pl
tel. 501 224 588