

# BADANIA MODELOWE NAD PATOGENEZĄ OSPY PRAWDZIWEJ: WPŁYW ORTOPOKSWIRUSÓW KROWIANKI, OSPY MYSZY I OSPY BYDŁA NA AKTYWACJĘ CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO NF-κB

Justyna Struzik, Marek Niemiałowski\*

Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie,  
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Wpłynęło w marcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Strategie immunomodulacyjne pokswirusów. 3. Rodzina czynników transkrypcyjnych NF-κB jako cel komórkowy immunomodulacji wirusowej. 4. Interakcje wirusa krowianki (VACV) z NF-κB. 5. Wpływ wirusa ospy myszy (ektromelii; ECTV) na aktywację NF-κB. 6. Interferencja wirusa ospy bydła (CPXV) z aktywacją NF-κB. 7. Podsumowanie

## Model studies on smallpox pathogenesis: the influence of vaccinia, mousepox and cowpox orthopoxviruses on the activation of transcription factor NF-κB

1. Introduction. 2. Poxvirus immunomodulatory strategies. 3. The NF-κB family of transcription factors as a cellular target for viral immunomodulation. 4. Interactions between vaccinia virus (VACV) and NF-κB. 5. The influence of mousepox (ectromelia; ECTV) virus on the activation of NF-κB. 6. Cowpox virus (CPXV) interference with the activation of NF-κB. 7. Summary

**Abstract:** Successful replication of the viral genome and the spreading of progeny virions are ensured by a repertoire of virus-encoded immunomodulatory proteins, which enable avoiding different mechanisms of cell response which are directed against pathogens. These strategies have also been evolved by poxviruses, which are being studied extensively due to the threat of the recurrence of smallpox caused by variola virus (VARV). This work describes three model viruses that are used in smallpox pathogenesis studies: vaccinia virus (VACV), ectromelia virus (ECTV) and cowpox virus (CPXV) and their influence on nuclear factor κB (NF-κB) activation. NF-κB is a widely studied multifunctional transcription factor that regulates both innate and adaptive mechanisms of immune response. The classical pathway of NF-κB activation is stimulated by viral infections; moreover, it can be modified by viral gene products. Poxvirus immunomodulatory proteins that interfere with NF-κB activation can be divided into several groups: ligand inhibitors, intracellular inhibitors of NF-κB, ankyrin repeat (ANK) NF-κB inhibitors and PYRIN domain (PYD) NF-κB inhibitors. The studies on their influence on the host immune response will lead to better understanding of viral pathogenesis and may help in drug and vaccines engineering in the future.

---

**Słowa kluczowe:** immunomodulacja, NF-κB, wirus krowianki, wirus ospy bydła, wirus ospy myszy (ektromelii)  
**Key words:** cowpox virus, immunomodulation, mousepox (ectromelia) virus, NF-κB, vaccinia virus

---

## 1. Wstęp

Choroby wirusowe od wieków stanowią duże wyzwanie dla ludzi i zwierząt oraz rozwijającej się medycyny. Wiele czynników je wywołujących, jak np. wirus grypy typu A (influenza virus A, H5N1), ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus, HIV), wirus brodawczaka ludzkiego (human papillomavirus, HPV), jest przedmiotem projektów badawczych Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO), prowadzonych w różnych krajach oraz obiektem szczególnie zintensyfikowanych badań nad szczepionkami. W związku ze zmiennością antygenową patogenów takich jak HIV, trwa nieustanny „wyścig zbrojeń” pomiędzy naukowcami a wirusami, z których liczne wciąż stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia ludzkości. Ponadto, wykształcone w toku ewolucji przystosowania, polegające na modulacji mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, umożliwiają

wirusom przetrwanie i efektywną replikację w komórkach gospodarza.

Pokswirusy, ludzkie i zwierzęce dsDNA wirusy o dużym genomie (130–360 kbp), zawierającym zwykle ponad 150 genów, stanowią grupę patogenów zdolnych do efektywnej immunomodulacji. Ich cykl replikacyjny przebiega wyłącznie w cytoplazmie zakażonych komórek, co wyróżnia je spośród innych dsDNA wirusów [52]. Patogeny te należą do rodziny *Poxviridae*, obejmującej dwie podrodziny: *Chordopoxvirinae*, wirusy kręgowców i *Entomopoxvirinae*, wirusy owadów oraz niesklasyfikowane dotąd trzy gatunki wirusów. Do podrodziny *Chordopoxvirinae* zalicza się osiem rodzajów: *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus* i *Yatapoxvirus*. Rodzaj *Orthopoxvirus* obejmuje wirusy: ospy prawdziwej (variola virus, VARV), krowianki (vaccinia virus, VACV), ektromelii – ospy myszy (ectromelia virus, ECTV), ospy bydła (cowpox virus, CPXV), ospy

---

\* Autor korespondencyjny: Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; tel./fax. (22) 59 360 66; email: [marek\\_niemialowski@sggw.pl](mailto:marek_niemialowski@sggw.pl)

– Wykaz użytych skrótów na końcu pracy

małp (monkeypox virus, MPXV) i inne [68]. VARV, jeden z najbardziej znanych i groźnych wirusów, został pokonany dzięki kampanii masowych szczepień, przeprowadzonej w latach 1967–1977 przez WHO, która w 1980 roku ogłosiła raport o wyeliminowaniu zachorowań na ospę prawdziwą [94]. Pomimo tego osiągnięcia, wciąż istnieje prawdopodobieństwo ponownego pojawienia się ospy ludzkiej, ponieważ nie można wykluczyć istnienia rezerwuaru VARV w przyrodzie. Wirus ten przechowywany jest obecnie w dwóch laboratoriach znajdujących się w USA (US CDC&P, Atlanta) oraz w Rosji (Instytut Wirusologii, Moskwa), a możliwość jego użycia w celu ataku bioterrorystycznego potwierdza zasadność badań modelowych i innych prowadzących do opracowania nowoczesnych, wydajnych preparatów profilaktycznych (np. szczepionek) i leczniczych przeciwko ospie prawdziwej [9, 64]. Warto również zaznaczyć, iż obecnie ortopokswirusy stanowią zagrożenie zarówno dla zwierząt laboratoryjnych (ECTV), jak i hodowlanych czy dziko żyjących oraz są źródłem chorób odzwierzęcych (VACV, CPXV, MPXV). VARV i ECTV wykazują specyficzność w stosunku do jednego gospodarza (odpowiednio: człowiek i mysz), zaś CPXV jest patogenem endemicznym występującym u szczurów i powodującym zakażenia u bydła oraz u ludzi [33].

Zakażenia ortopokswirusowe mogą przybierać formę uogólnioną (ospa myszy), bądź miejscową (ospa bydła) lub obydwie z wymienionych (ospa prawdziwa) i powodują wystąpienie zmian skórnych w postaci wysypki, a uogólniona infekcja może prowadzić do śmierci [55]. Do badań nad patogenezą ospy prawdziwej wykorzystuje się VACV, CPXV i ECTV, który jest naturalnym patogenem genetycznie wrażliwych szczepów myszy [33], używanej jako organizm modelowy do takich doświadczeń.

Niniejsza praca przedstawia różnorodność wykształconych przez ortopokswirusy mechanizmów immunomodulacyjnych, w wyniku których dochodzi do zmian w aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B). Białko to pełni liczne funkcje w komórce i może być uznane za cel terapeutyczny w leczeniu chorób wirusowych.

## 2. Strategie immunomodulacyjne pokswirusów

Pokswirusy kodują liczne białka, które umożliwiły tym patogenom niezależenie się od maszynery transkrypcyjnej gospodarza, a także, zakłócanie ekspresji genów zakażonych komórek, bez zaburzania ekspresji ich własnych genów [60, 62]. W procesie replikacji genomu pokswirusów biorą udział produkty wysoce konserwatywnych genów, występujących w centralnej jego części, z której region o długości 100 kbp charakteryzuje ponad 90% podobieństwo wśród wirusów

z rodzaju *Orthopoxvirus* [30, 40]. Badania nad VACV wykazały, iż około 25% z 200 otwartych ramek odczytu (open reading frames, ORFs) nie jest koniecznych do replikacji tego wirusa *in vitro*, co więcej, wiele z nich koduje białka, które służą modyfikacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza podczas cyklu replikacyjnego VACV. Większość genów, kodujących takie modyfikatory, obecna jest w rejonach terminalnych genomu i charakteryzuje się dużą zmiennością w obrębie rodziny *Poxviridae*, a wystąpienie nawet kilku zmian w sekwencji aminokwasowej izologów białek należących do różnych pokswirusów wiąże się ze zmianą ich specyficzności. Białka te to modyfikatory mechanizmów odpornościowych gospodarza (host-response modifiers, HRMs), uznawane za niezbędne do utrzymania się wirusa w środowisku, ponieważ wpływają na procesy przeciwdziałające jego replikacji i rozprzestrzenianiu się w zakażonym organizmie. Zadaniem HRMs jest bowiem modyfikacja mechanizmów odpowiedzi na zakażenie, procesów syntezy makromolekuł w komórce gospodarza, a także apoptozy [21].

Immunomodulatory pokswirusowe służą „ukrywaniu się” wirusa w komórce, jego transdukcji oraz mimikrze wirusowej [47]. Do takich modyfikatorów należy m.in. białko wczesne M153R, które zostało odkryte u należącego do rodzaju *Leporipoxvirus* wirusa myksomatozy (myxoma virus, MYXV). Występuje ono w retikulum endoplazmatycznym (endoplasmic reticulum, ER) i przeznaczona do degradacji w lizosomach białka głównego układu zgodności tkankowej klasy I (major histocompatibility complex class I, MHC-I) związane z  $\beta$ 2-mikroglobuliną. Występując w roli ligazy ubikwityny, M153R przyczynia się również do lizosomalnej degradacji CD4 [41, 56]. Takie przystosowania służą unikaniu odpowiedzi ze strony mechanizmów wrodzonych, a także komórkowych mechanizmów obrony przeciwwirusowej, w której uczestniczą komórki „naturalni zabójcy” (natural killers, NK) i limfocyty T cytotoksyczne (cytotoxic T lymphocytes, CTL). Istotnym elementem tej obrony jest apoptoza zakażonych komórek, która podlega skutecznej modulacji przez pokswirusowe białka, takie jak MC159 wirusa mięczaka zakaźnego (molluscum contagiosum virus, MCV) z rodzaju *Molluscipoxvirus*. MC159 zawiera dwie domeny efektorowe śmierci (death effector domains, DEDs), które zapobiegają apoptozie indukowanej przez tzw. receptory śmierci [7]. Inne białko, p28 ECTV, w wyniku interakcji z kaspazą 3, blokuje apoptozę komórek indukowaną przez UV [14]. Do inhibitorów apoptozy należą również wewnątrzkomórkowe serpiny jak, na przykład, białko modyfikujące odpowiedź cytokinową CrmA (cytokine response modifier A) CPXV, które hamuje zarówno wewnętrzny, jak i zewnętrzny szlak apoptotyczny [71]. Białka CrmA i CrmD blokują apoptozę dzięki odpowiednio: inhibicji kaspaz: 1 oraz

8 i poprzez wiązanie czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) [53, 92]. Wiązanie TNF- $\alpha$ , a także innych molekuł gospodarza, umożliwiając, służące mimikrze wirusowej, modulatory zwane wiroweceptorami i wirokinami. Modyfikatory te ingerują w szlaki zewnątrzkomórkowe, służące regulacji wczesnej odpowiedzi przeciwwzpalnej na poziomie dopełniacza, interferonów (interferon, IFN), cytokin prozapalnych, chemokin i czynników wzrostu [47]. Do takich immunomodulatorów zalicza się, między innymi, wirusowy receptor interleukiny 1 $\beta$  (viral IL-1 $\beta$  receptor, vIL1 $\beta$ R), cytokiny odpowiadającej za zapoczątkowanie procesu zapalnego podczas zakażenia i indukującej aktywność wielu innych cytokin o rozmaitych funkcjach. vIL1 $\beta$ R wykazuje podobieństwo sekwencji do zewnątrzkomórkowej domeny receptora IL-1 $\beta$  typu II i zapobiega wiązaniu z nim tej cytokiny. Wiroreceptor ten występuje u VACV, ECTV i CPXV, jakkolwiek różnice w sekwencji aminokwasowej białek kodowanych przez te patogeny mają wpływ na różną zdolność wiązania przez nie IL-1 $\beta$ . Stwierdzono bowiem, iż zdolność ta jest słabsza w przypadku białka kodowanego przez ECTV [21]. Innym, znanym wiroweceptorem jest wirusowy receptor TNF (viral TNF receptor, vTNFR), wiążący TNF- $\alpha$ , cytokinę zaangażowaną w odpowiedź przeciwwirusową. vTNFR występuje pod postacią różnych białek kodowanych przez geny *Crm* CPXV, a ich ortologi obecne są w genomach VARV, ECTV i innych ortopokswirusów.

Do białek kodowanych przez tę grupę patogenów należą także wiorkiny, do których zalicza się białka wiążące IL-18 (IL-18 binding proteins, IL-18BPs). IL-18 jest cytokiną prozapalną, indukującą IFN- $\gamma$  oraz inne cytokiny i chemokiny, a także aktywującą komórki NK. IL-18BPs stanowią rodzinę białek pokswirusowych (występują, między innymi, u VACV, ECTV, MCV), wykazujących duże podobieństwo sekwencji i sposobu wiązania tej cytokiny, lecz niehomologicznych w stosunku do komórkowego receptora IL-18 [1, 31]. Innym białkiem o podobnych właściwościach, wykazującym wysoką konserwatywność w obrębie ortopokswirusów (w przypadku ECTV jedynie szczep Mill Hill nie wytwarza tego białka), jest rozpuszczalny inhibitor chemokin typu CC, wirusowe białko wiążące chemokiny typu CC (viral CC chemokine-binding protein, vCC-CKBP) [83]. Ponadto, ortopokswirusy kodują homologi receptora komórkowego IFN- $\gamma$  (viral IFN- $\gamma$  receptor, vIFN- $\gamma$ R), dzięki którym hamują działanie tej cytokiny [84].

Przedstawiony powyżej repertuar pokswirusowych immunomodulatorów daje obraz wykształconych przez te patogeny w toku ewolucji doskonałych przystosowań, które świadczą o ich wyjątkowych zdolnościach adaptacyjnych. Ze względu na centralną rolę czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B w regulacji procesów związanych ze szlakami komórkowymi, obejmującymi aktywację wyżej wymienionych molekuł, jak również z wrodzo-

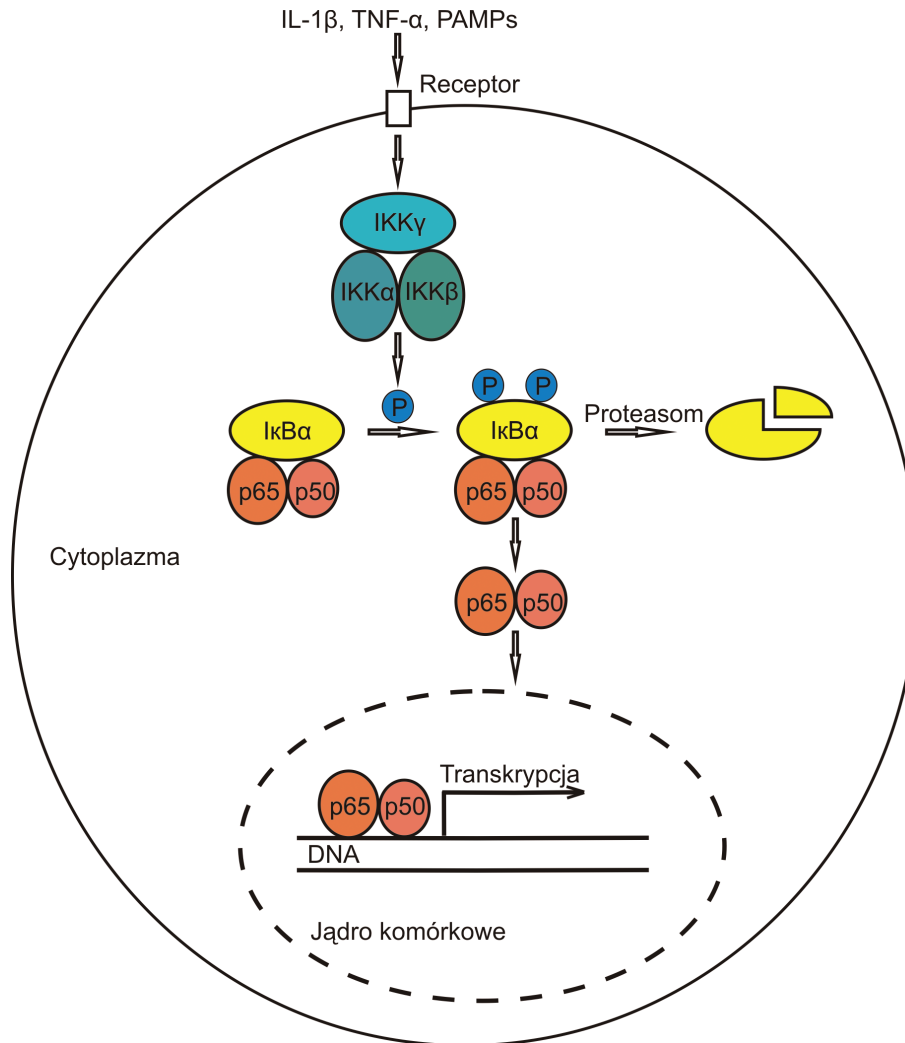
nymi i nabytymi mechanizmami odpowiedzi immunologicznej, jest on celem wirusowych mechanizmów immunomodulacyjnych, działających na różnych etapach jego aktywacji.

### 3. Rodzina czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B jako cel komórkowy immunomodulacji wirusowej

Ekspresja genów w komórkach eukariotycznych podlega ściśle regulacji, która odbywa się głównie na etapie transkrypcji. Przebieg tego procesu uzależniony jest zaś od aktywności białek regulatorowych, zwanych czynnikami transkrypcyjnymi, spośród których NF- $\kappa$ B jest niezwykle popularnym obiektem badań. Wynika to z pełnionych przez to białko licznych funkcji, do których należy, między innymi, regulacja cyklu komórkowego, udział w procesie apoptozy, czy indukcja wrodzonych i nabytych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej podczas zakażeń bakteryjnych i wirusowych. W związku z rolą, jaką NF- $\kappa$ B pełni podczas zakażeń wirusowych, zmiany aktywności tego czynnika powodowane przez niektóre wirusy przyczyniają się do skutecznej replikacji i rozprzestrzeniania się tych patogenów w zakażonym organizmie [44].

Odkrycie w 1986 r. NF- $\kappa$ B, jądrowego czynnika wiążącego sekwencję wzmacniającą genu łańcucha lekkiego  $\kappa$  immunoglobulin [78] w limfocytach B myszy, zapoczątkowało liczne badania nad udziałem tego białka w różnych procesach, w tym w odpowiedzi immunologicznej. Czynnikiem transkrypcyjnym NF- $\kappa$ B, zidentyfikowany również u *Drosophila melanogaster*, występuje u kręgowców jako konserwatywny ewolucyjnie element [39]. Białka z rodziny NF- $\kappa$ B, zwanej również Rel, ze względu na ich homologię z wirusową onkoproteiną v-Rel, charakteryzuje obecność N-terminalnej domeny homologicznej Rel (Rel homology domain, RHD), która uczestniczy w wiązaniu tych czynników z DNA, ich dimeryzacji, translokacji do jądra komórkowego oraz w interakcji NF- $\kappa$ B z białkami inhibitorowymi [37, 69].

Rodzina czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B obejmuje pięć ssaczych białek: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50) i NF- $\kappa$ B2 (p52), z których dwa ostatnie powstają w wyniku modyfikacji potranslacyjnych prekursora (odpowiednio: p105 i p100). Wykazano obecność NF- $\kappa$ B w niemal wszystkich typach ssaczych komórek, w których występuje on w postaci homo- i heterodimerów. Białka należące do rodziny NF- $\kappa$ B pełnią rolę zarówno aktywatorów transkrypcji, jak i represorów tego procesu (homodimery p50/p50 lub p52/p52). Induktorem transkrypcji genów jest C-terminalna domena transaktywująca (transactivation domain, TAD) obecna w cząsteczkach trzech białek tej rodziny: p65, RelB i c-Rel. Białko p65 zawiera dwie takie



Rys. 1. Klasyczna droga aktywacji NF-κB

Oddziaływanie czynników, takich jak cytokiny prozapalne (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) czy molekularne wzorce patogenności (PAMPs) z receptorami na powierzchni komórki prowadzi do aktywacji kinazy I $\kappa$ B (IKK), złożonej z podjednostek IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  i IKK $\gamma$ . Aktywna kinaza IKK fosforyluje inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ , który ulega następnie ubiquitynacji i degradacji w proteasomie. Uwolniony czynnik NF- $\kappa$ B w postaci heterodimeru p65/p50 przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie reguluje transkrypcję odpowiednich genów.

domeny, dlatego jest ono najsilniejszym aktywatorem tego procesu [76].

NF- $\kappa$ B należy do grupy czynników transkrypcyjnych zwanych utajonymi czynnikami cytoplazmatycznymi, które występują w formie nieaktywnej w cytoplazmie komórki. Ich aktywacja następuje w wyniku wysoce specyficznej reakcji typu polipeptyd-receptor, polegającej na związaniu białkowej molekuly sygnałowej z receptorem powierzchniowym komórki i uruchomieniu kaskady sygnałów wewnątrz komórki [15]. W wyniku takich oddziaływań dochodzi do transkrypcji genów kodujących cytokiny, cząsteczki adhezyjne, enzymy, czy receptory komórkowe, które biorą udział w różnych procesach, w tym obronnych i związanych z zapaleniem [6]. Określeniu roli poszczególnych białek z rodziny NF- $\kappa$ B posłużyły zwierzęta transgeniczne. Myszy z nokautem genu kodującego podjednostkę p65 wykazywały letalny fenotyp embrionalny wraz z rozległą apoptozą komórek

wątroby [8]. Uszkodzenie genu *relB* powodowało z kolei atrofię grasicy, a *c-rel* – zmniejszenie produkcji cytokin przez limfocyty T i makrofagi, zaś nokaut genów *nfkb1* i *nfkb2* skutkowało upośledzoną reakcją ze strony limfocytów B [20].

Klasyczna droga aktywacji NF- $\kappa$ B (Rys. 1) indukowana jest przez cytokiny prozapalne (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), receptory Toll-podobne (Toll-like receptors, TLRs) bądź wirusy i stanowi kluczowy element wrodzonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej [25, 51]. W przebiegu klasycznej aktywacji NF- $\kappa$ B, występującego w komórkach najczęściej w postaci heterodimeru p65/p50, dochodzi do fosforylacji reszt serynowych (Ser32 i Ser36) inhibitora  $\kappa$ B $\alpha$  (inhibitor  $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ ), i, w konsekwencji, odblokowania sekwencji sygnałowej NF- $\kappa$ B, zwanej sygnałem lokalizacji jądrowej (nuclear localization signal, NLS), która osłaniana jest przez bogatą w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę (proline,

glutamic acid, serine, and threonine, PEST) C-końcową domenę inhibitora. Dzięki temu dochodzi do translokacji NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego i degradacji ufosforylowanego i ubikwitynowanego białka I $\kappa$ Ba w proteasomie [10, 69]. Centralnym regulatorem tego procesu jest kompleks kinazy I $\kappa$ B (I $\kappa$ B kinase, IKK), który bierze udział w fosforylacji inhibitora. Aktywność I $\kappa$ Ba, z kolei, podlega regulacji w ten sposób, iż gen kodujący I $\kappa$ Ba znajduje się pod kontrolą NF- $\kappa$ B, w związku z czym zwiększona aktywność inhibitora pomaga w indukcji sekwestracji NF- $\kappa$ B w cytoplazmie [46, 73].

NF- $\kappa$ B może być również aktywowany na drodze alternatywnej lub indukowanej uszkodzeniami DNA. Pierwsza z nich stymulowana jest m. in. receptor limfotoksyny  $\beta$  (lymphotoxin  $\beta$  receptor, LT $\beta$ R), receptor czynnika aktywującego limfocyty B (B cell activating factor receptor, BAFFR), czy CD40 i obejmuje aktywację IKK $\alpha$  i kinazy aktywującej NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B-inducing kinase, NIK) oraz częściową degradację prekursora podjednostki p52, p100. Taki sposób aktywacji NF- $\kappa$ B jest konieczny dla rozwoju i aktywacji limfocytów. Ponadto, ścieżkę tę mogą indukować niektóre wirusy, takie jak ludzki wirus białaczki T-limfocytarnej typu 1 (HTLV-1). Trzecią drogą aktywacji NF- $\kappa$ B, nie obejmującą aktywacji IKK, stymulują czynniki uszkodzające DNA, takie jak związki chemiczne czy UV [25, 27].

Czynnik NF- $\kappa$ B aktywowany jest, jak już wspomniano, podczas zakażeń wirusowych. Co więcej, patogeny te, jak np. HIV typu 1 (HIV-1), HTLV-1, wirus zapalenia wątroby typu B (HBV), wirus zapalenia wątroby typu C (HCV), wirus grypy czy adenowirusy, wykazują zdolność do interakcji ze szlakami aktywacji NF- $\kappa$ B, co pozwala uniknąć mechanizmów efektorowych gospodarza. Dodatkowo, w genomie niektórych wirusów, jak HIV, wirus opryszczki pospolitej (HHV-1/HSV-1), adenowirusy, cytomegalowirus (CMV), występują miejsca wiązania tego czynnika transkrypcyjnego, zwane miejscami  $\kappa$ B [66], które mogą przyczyniać się do zwiększenia efektywności transkrypcji wirusa. Takie przystosowania pozwalają na ucieczkę przed mechanizmami efektorowymi zakażonego gospodarza i stworzenie warunków sprzyjających skutecznej replikacji genomu wirusowego.

Pokswirusy stanowią grupę patogenów zdolnych do modulacji ścieżek sygnałowych komórki gospodarza w sposób umożliwiający efektywną ich replikację. NF- $\kappa$ B jest szczególnym celem takiej modulacji, ponieważ ekspresja pokswirusowych genów zachodzi w cytoplazmie zakażonej komórki, gdzie czynnik ten ulega aktywacji. Pokswirusowe białka immunomodulatorowe można zaklasyfikować do kilku grup, które obejmują: inhibitory ligandów, wewnątrzkomórkowe inhibitory NF- $\kappa$ B, inhibitory NF- $\kappa$ B zawierające powtórzenia ankirynowe (ankyrin repeats, ANK) oraz inhibitory NF- $\kappa$ B zawierające domenę PYRIN (PYRIN domain, PYD) [60].

#### 4. Interakcje wirusa krowianki (VACV) z NF- $\kappa$ B

Wirus krowianki, VACV, prototypowy patogen o niewyjaśnionym dotąd pochodzeniu, który posłużył do produkcji szczepionki przeciwko ospie prawdziwej, jest popularnym modelem do badań nad patogenezą ortopokswirusów. W przyrodzie istnieje kilka jego wariantów, które mogą być również chorobotwórcze dla człowieka. Należy do nich, uważany za podgatunek VACV, wirus ospy bawołów. Jest on rozpowszechniony na całym świecie i występuje u ludzi, bydła, bawołów i królików, a jego rezerwuarem są głównie gryzonie [29]. VACV przenosi się ze zwierząt na człowieka podczas dojenia, a uszkodzenia skóry strzyków sprzyjają jego transmisji przez dojarzy na inne zwierzęta. Zoonotyczne szczepy VACV, występujące np. w Brazylii, powodują u bydła i ludzi objawy grypopodobne, a także wystąpienie krost i owrzodzeń oraz powiększenie węzłów chłonnych i po kilku tygodniach pozostawiają charakterystyczne blizny [81]. Ponadto, stwierdzono przypadki zakażeń VACV u ludzi pracujących w laboratoriach badawczych [17]. Poza zagrożeniem dla zdrowia publicznego, VACV stanowi źródło strat ekonomicznych. Z drugiej strony jednak, wirus ten jest obecnie bardzo użyteczny, ponieważ wykorzystuje się go jako wektor do konstrukcji szczepionek, na przykład, przeciwko wściekliźnie, a także jako nośnik dużych sekwencji DNA, które nie pozbawiają go zdolności do replikacji [88], co czyni VACV dobrym narzędziem inżynierii genetycznej.

VACV oraz inne ortopokswirusy są obiektem licznych badań, zmierzających, między innymi, do opracowania szczepionki przeciwko ospie prawdziwej – choroby, która wciąż stanowi zagrożenie dla ludzkości. Jak już wspomniano, konserwatywne białka kodowane przez te patogeny wykazują zdolność do modulacji ścieżek sygnałowych związanych z, między innymi, aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (Tab. I).

W genomie VACV stwierdzono obecność genów kodujących inhibitory ligandów, takie jak wirusowe receptory TNF i IL-1 $\beta$ , a także IL-18BP i wykazano, iż delecja genu VACV szczepu Western Reserve (VACV strain Western Reserve, VACV-WR), kodującego IL-18BP powoduje atenuację tego wirusa [2, 79, 85, 90]. Immunomodulatorowe białka VACV to także wewnątrzkomórkowe inhibitory NF- $\kappa$ B, które mogą mieć wpływ na mechanizmy wrodzone odpowiedzi immunologicznej, przebiegające z udziałem TLRs. Receptory te rozpoznają tzw. molekularne wzorce patogenności (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), do których należą, na przykład, lipopolisacharydy (lipopolysaccharides, LPS) bakterii Gram-ujemnych, kwas lipotejchojowy, białka drożdży, czy kwas nukleinowy wirusów (jedno- lub dwuniciowy RNA) [58]. Zakłócanie przekazywania sygnałów przez TLRs, i, w konsekwencji, interferencja z aktywacją NF- $\kappa$ B zachodzi przy udziale białek VACV,

Białka immunomodulatorowe modelowych ortopokswirusów i ich oddziaływanie z NF-κB

Grupa białek	Funkcja
Inhibitory ligandów	<ul style="list-style-type: none"> <li>• wiązanie IL-1β, TNF-α, CD153 (wiroreceptory: vIL1βR, vTNFR, vCD30)</li> <li>• wiązanie IL-18 (wirokiny: IL-18BPs)</li> </ul>
Wewnątrzkomórkowe inhibitory NF-κB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zakłócanie przekazywania sygnałów przez IL-1 i TLRs (A46R, A52R, N1L)</li> <li>• hamowanie aktywności IKK (B14)</li> <li>• hamowanie aktywności PKR (E3L, K3L)</li> <li>• hamowanie aktywności ERK2 (M2L)</li> </ul>
Inhibitory NF-κB zawierające powtórzenia ankirynowe	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zakłócanie przekazywania sygnałów przez TLRs (K1L)</li> <li>• zapobieganie degradacji IκBα (K1L)</li> <li>• wiązanie i hamowanie aktywacji NF-κB (ECTV-002, CPXV-006, CP77)</li> </ul>

A46R i A52R. A46R, dzięki podobieństwu sekwencji aminokwasowej tego białka do cytoplazmatycznej domeny receptora Toll/IL-1 (Toll/IL-1 receptor, TIR), działa jako antagonistą przekazywania sygnałów przez IL-1 i TLRs, przy czym ma ono zdolność do częściowej inhibicji aktywacji NF-κB przez IL-1. A52R zaś, efektywnie blokuje aktywację NF-κB indukowaną przez IL-1 oraz TLR4. Odkrycie takich oddziaływań dało możliwość lepszego poznania zależnych od domeny TIR ścieżek sygnałowych, aktywowanych podczas zranień i zakażeń (zwłaszcza wirusowych) i związanych z nimi mechanizmów ucieczki przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza [13]. Dalsze badania nad oddziaływaniem wirusowych białek z TLRs pokazały, iż A52R jest wewnątrzkomórkowym inhibitorem sygnałów przekazywanych przez różne rodzaje tych receptorów i, w konsekwencji, czynnikiem blokującym aktywację NF-κB. Szczególnym celem takiej immunomodulacji jest TLR3, który, jako receptor wirusowego RNA, jest istotnym elementem odpowiedzi wrodzonej podczas zakażeń spowodowanych tymi patogenami [58]. Wykazano również, iż zarówno A52R, A46R, jak i inne białka VACV: N1L oraz K1L, wykazują zdolność do hamowania w pierwotnych komórkach mikrogleju szlaków sygnałowych zależnych od TLRs. Jest to istotne odkrycie ze względu na ważną rolę komórek mikrogleju w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), gdzie indukują one wrodzone mechanizmy odpowiedzi immunologicznej, skierowanej przeciwko patogenom [70].

Kluczowym regulatorem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej podczas zakażeń wirusowych jest podjednostka IKKβ kinazy IKK [24]. IKK jest zatem doskonałym celem dla patogenów, takich jak pokswirusy, które oddziałują z IKK za pomocą konserwatywnego w obrębie rodziny *Poxviridae* białka B14 [22]. Ten wewnątrzkomórkowy czynnik wirulencji został odkryty u VACV-WR, a jego ekspresja w komórkach linii HeLa zapobiega aktywacji NF-κB indukowanej przez TNF-α, IL-1β, kwas poli I:C oraz 12-mirystynian, 13-octan forbolu (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA). Dowiedziano również, iż zakażenie mutantem VACV z delecją

genu *B14R* (vΔB14) skutkuje wyższym poziomem ufosforylowanego białka inhibitorowego IκBα w komórce, przy porównywalnym poziomie IκBα w stosunku do komórek zakażonych wirusem wykazującym ekspresję tego genu. Na tej podstawie stwierdzono, iż B14 oddziałuje na aktywność IKK i dowiedziano istnienie takiego oddziaływania w komórkach linii MEF i HeLa. Dodatkowo zaobserwowano, iż obecność podjednostki IKKβ jest konieczna do interakcji B14 z IKK [23].

Aktywacja NF-κB może ulegać zakłóceniom również na etapie degradacji inhibitora IκBα przez zawierające powtórzenia ankirynowe białko K1L, kodowane przez dziki szczep VACV, zwany Ankara. Insercja, pochodzącego od tego szczepu i zawierającego trzy geny, w tym *K1L*, fragmentu DNA o długości 5,2 kbp do DNA atenuowanego, zmodyfikowanego wirusa krwiarki szczep Ankara (modified vaccinia virus Ankara, MVA) i porównanie wpływu zakażenia takim wirusem i VACV-WR (dziki szczep z delecją *K1L*) na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB dała wynik pokazujący, iż K1L odgrywa rolę nie tylko inhibitora NF-κB w komórkach linii RK13, ale również represora transkrypcji genu kodującego TNF, która podlega regulacji przez ten czynnik [80].

Pokswirusy, w tym również VACV, oddziałują także na aktywność kinazy białkowej R, aktywowanej przez dwuniciowy RNA (protein kinase R, PKR). Enzym ten pełni funkcję mediatora odpowiedzi antywirusowej związanej z działaniem IFN oraz aktywuje NF-κB poprzez fosforylację IκB [50], a stymulacja dsRNA komórek z defektem kinazy PKR skutkuje upośledzoną aktywacją NF-κB. Inaktywacja ścieżki sygnałowej kinazy PKR może zachodzić dzięki wiązaniu dsRNA przez białko E3L VACV, co zapobiega aktywacji PKR przez dsRNA. Inne białko VACV, K3L, z kolei, uniemożliwia wiązanie podjednostki α eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2 (α subunit of eukaryotic translation initiation factor-2, eIF-2α) przez kinazę PKR, przeciwdziałając tym samym fosforylacji eIF-2α. W ten sposób aktywność kinazy zostaje zniesiona, i w efekcie nie zachodzi indukowany przez PKR proces apoptozy,

w którym, oprócz eIF-2 $\alpha$ , bierze także udział NF- $\kappa$ B [38, 48]. Dalsze badania dowiodły, iż PKR ulega aktywacji na wczesnym etapie zakażenia VACV, jeśli wirus ten nie wykazuje ekspresji białka K1L, które ma zdolność hamowania aktywacji PKR przez wczesne lub późne transkrypty genów VACV [93].

VACV oddziałuje na aktywację NF- $\kappa$ B również za pomocą wysoce konserwatywnego wśród ortopokswirusów białka M2L, które hamuje aktywność kinazy aktywowanej zewnątrzkomórkowo 2 (extracellular regulated kinase 2, ERK2), indukującej IKK. Badania z życiem komórek linii HEK 293T zakażonych rekombinowanym wirusem MVA, wykazującym ekspresję tego białka, wykazały obniżoną fosforylację ERK2 w wymienionych komórkach. Ponadto, wprowadzenie do tych komórek konstruktów rekombinowanego wirusa MVA powodowało osłabienie migracji NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego [36]. Zaobserwowano również kolokalizację M2L z białkami ER i ekspresję tego białka we wczesnych stadiach zakażenia VACV. Kolokalizacja z białkami retikulum oraz obecność sekwencji sygnałowej białka M2L są konieczne do inhibicji NF- $\kappa$ B. Dodatkowo wykazano, iż brak motywu c-końcowego (tzw. ER retention motif) M2L zapobiega hamowaniu NF- $\kappa$ B i nie zaburza procesu translokacji NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego. Wyniki tych badań wskazują na udział białka M2L w patogenezie *in vivo* oraz na możliwość regulacji ścieżek sygnałowych związanych z ER podczas zakażeń innymi wirusami [43].

Najnowsze doniesienia wskazują na obecność w genomie VACV genów kodujących niezidentyfikowane dotąd inhibitory NF- $\kappa$ B. Badania przeprowadzone nad mutantem tego wirusa (VV811) z delecjami wszystkich znanych inhibitorów aktywacji NF- $\kappa$ B indukowanej przez TNF- $\alpha$  (łącznie 55 ORFs) wykazały, iż w komórkach linii HeLa zakażonych VV811, translokacja NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego ulega zahamowaniu po stymulacji TNF- $\alpha$  lub IL-1 $\beta$ . Ponadto zaobserwowano, że zakażenie VV811 hamuje indukowaną TNF- $\alpha$  degradację I $\kappa$ Ba i doprowadza do gwałtownej akumulacji ufosforylowanego białka I $\kappa$ Ba w komórkach. Stwierdzono również, że stabilizacja I $\kappa$ Ba jest uwarunkowana ekspresją późnego genu VACV. Wyniki tych badań świadczą o tym, iż NF- $\kappa$ B odgrywa znaczącą rolę podczas zakażeń wirusowych [32].

Do badań nad szczepionką przeciwko ospie prawdziwej i innym chorobom zakaźnym wykorzystuje się, wspomniany już, atenuowany i immunogeny szczep MVA [89]. Analiza ekspresji genów komórek linii HeLa zakażonych MVA wykazała zależną od replikacji wirusowego DNA stymulację ekspresji NF- $\kappa$ B, a także zwiększoną ekspresję białka oddziałującego z TRAF (TRAF-interacting protein, TRIP), uczestniczącego w przekazywaniu sygnałów związanych z aktywacją NF- $\kappa$ B [42]. Wyniki te są zgodne z poprzednimi analizami, które wykazały, iż MVA może aktywować NF- $\kappa$ B

bez dodatkowej stymulacji przez czynniki środowiska czy też inne, dodatkowe sygnały [65]. Wykazano również gwałtowną fosforylację ERK2 oraz następującą po niej aktywację NF- $\kappa$ B po zakażeniu komórek HEK 293T MVA [57]. Wyniki tych badań potwierdzają hipotezę mówiącą, iż wirusy są zdolne do kontrolowania aktywacji NF- $\kappa$ B oraz do wykorzystywania tego czynnika w celu regulacji ich cyklu życiowego. Zaobserwowano także, że aktywacja NF- $\kappa$ B w komórkach HEK 293T zachodzi na wczesnym etapie replikacji MVA, przy czym degradacja I $\kappa$ Ba wymaga zdarzenia zachodzącego jeszcze przed replikacją wirusowego DNA oraz ekspresji genów późnych. Ponadto dowiedziono, iż w komórkach linii CHO, a także HEK 293T oraz RK3 ekspresja genu wczesnego K1L hamuje proces wyczerpywania się puli I $\kappa$ Ba po indukcji przez MVA. W komórkach linii MEF zaś, ilość I $\kappa$ Ba może być zredukowana w zależności od ekspresji PKR (zarówno mysiej jak i ludzkiej), aktywowanej przez dsRNA. Zdolność MVA do generowania zależnej od kinazy PKR odpowiedzi immunologicznej na wczesnym etapie zakażenia, kiedy replikacja wirusa jest osłabiona, czyni go bezpiecznym i skutecznym wirusem szczepionkowym [54].

## 5. Wpływ wirusa ospy myszy (ektromelii; ECTV) na aktywację NF- $\kappa$ B

Wirus ospy myszy jest, obok VACV, wartościowym modelem do badań nad patogenezą ospy prawdziwej. Wykorzystuje się go również do testowania leków i szczepionek przeciwko ortopokswirusom [16]. ECTV występuje w Europie u gryzoni dziko żyjących, jednak zakażeniu nim mogą ulegać również myszy laboratoryjne, ponieważ ECTV przenosi się z łatwością nie tylko w wyniku bezpośredniego kontaktu, ale również poprzez zanieczyszczoną ściółkę, dlatego zakażenia tym wirusem stanowią duży problem ekonomiczny i naukowy w zwierzętarniach, gdzie prowadzone są różne badania, ze względu na możliwość ich zafałszowania [30, 34].

Zakażenie ECTV następuje w wyniku wnikięcia tego wirusa przez uszkodzoną skórę, w której ulega on replikacji. Proces ten obejmuje następnie miejscowe węzły chłonne (draining lymph nodes, DLN), po czym wirus przedostaje się do krążenia i wówczas dochodzi do wirerii pierwotnej. Następnie ECTV dociera do narządów mięsnych: wątroby i śledziony, w których namnaża się i dostaje się ponownie do krwiobiegu, co skutkuje wiracją wtórną. Wówczas następują zmiany w miejscu wnikięcia wirusa – skórze, gdzie obserwuje się występowanie opuchlizny na skutek reakcji zapalnej i odpowiedzi immunologicznej [30]. Spośród kilku znanych szczepów tego wirusa, szczep Moscow (ECTV-Moscow, ECTV-MOS) jest jednym z najbardziej zakaźnych [5].

Poszczególne haplotypy myszy różnią się między sobą wrażliwością na zakażenie ECTV. Szczepy myszy genetycznie opornych (np. C57BL6 [H-2<sup>b</sup>]) na zakażenie ECTV zdolne są do jego kontrolowania, wskutek czego objawy choroby są słabo wyrażone [19]. U myszy BALB/c (H-2<sup>d</sup>) zaś, wrażliwość taka jest wysoka, co skutkuje ich śmiercią około 7. dnia po zakażeniu (d.p.z.), które przybiera formę ostrą przy braku objawów klinicznych. Objawy te mogą jednak wystąpić pomiędzy 10. a 15. d.p.z. Zmiany, które pojawiają się w przebiegu zakażenia ECTV-MOS, są bardzo charakterystyczne i mają postać wysypki. Mogą one ulec przekształceniu w krosty, a te, z kolei, w owrzodzenia ospowe [63, 91]. Ponadto, ECTV, podobnie jak inne ortopokswirusy, może być czynnikiem etiologicznym zapalenia spojówek [49]. Niekiedy zakażenie tym wirusem prowadzi również do samoamputacji ogona lub odnóży wskutek nekrozy [86].

ECTV, podobnie jak inne ortopokswirusy, może wpływać na aktywację NF- $\kappa$ B. Analiza genomu tego wirusa wykazała, iż podobieństwo sekwencji prawego rejonu terminalnego genomu ECTV jest większe do VACV niż w stosunku do pozostałych ortopokswirusów. Dodatkowo, ORFs, kodujące białka związane bezpośrednio z immunomodulacją, zbadane u różnych izolatów ECTV, są wysoce konserwatywne [72]. Białka immunomodulatorowe ECTV powodują wygaszenie miejscowej odpowiedzi wrodzonej w skórze, co służy zapewnieniu skutecznego zakończenia cyklu replikacyjnego wirusa. Do takich czynników zalicza się, wspomniane już, vTNFR, vIL1 $\beta$ R, czy IL-18BP (p13) [12, 83].

Występujące w genomie ECTV ortologi genów VACV kodują białka, które wpływają na metabolizm komórki, w tym na aktywację NF- $\kappa$ B, działając jako m.in. inhibitory ligandów. Transdukcja sygnałów związanych z TNF jest zakłócana przez ECTV dzięki vTNFR [79], zaś IL-18BP ECTV blokuje aktywację NF- $\kappa$ B, która zachodzi na skutek działania IL-18, co zostało stwierdzone na podstawie badań *in vitro* z użyciem ludzkich komórek linii KG-1, w których oczyszczone białko IL-18BP szczepu Naval (ECTV-Naval, ECTV-NAV) hamowało aktywację NF- $\kappa$ B indukowaną przez IL-18. Dodatkowo, wykazano, iż IL-18BP ECTV wykazuje większą zdolność wiązania mysiej IL-18, w porównaniu z ludzką. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku białka CPXV, ponieważ gryzonie są naturalnymi gospodarzami tych patogenów [85].

Badania wykazały również obecność w genomie ECTV genu kodującego wewnątrzkomórkowy inhibitor NF- $\kappa$ B, który należy do rodziny inhibitorów kinazy I $\kappa$ Ba i jest odpowiednikiem cytoplazmatycznego białka N1L VACV, w stosunku do którego wykazuje on 93% podobieństwo, a jego hipotetyczną funkcją jest hamowanie przekazywania sygnałów przez TLRs i TNF. Wykazano także, że ECTV koduje odpowiednik cytoplazmatycznego białka K1L, które zapobiega degradacji I $\kappa$ Ba,

i którego podobieństwo do K1L VACV wynosi 97% [30].

Chordopokswirusy hamują aktywację NF- $\kappa$ B również za pomocą białek zawierających powtórzenia ankirynowe odpowiedzialne za interakcje typu białko-białko. Białka te występują u ECTV, jak również u VARV (białko G1R), jako wysoce konserwatywne molekuły, które poprzez interakcję z NF- $\kappa$ B1/p105 prowadzą do zahamowania aktywacji NF- $\kappa$ B w transfekowanych komórkach. Stwierdzono, iż odpowiednik G1R, białko ECTV-MOS ECTV-002, ma zdolność do inhibicji aktywacji NF- $\kappa$ B indukowanej przez TNF- $\alpha$  w komórkach linii HEK293. W komórkach linii HeLa zaś, hamuje ono TNF-zależną degradację NF- $\kappa$ B1/p105 i translokację podjednostki p65 do jądra komórkowego [59, 60].

## 6. Interferencja wirusa ospy bydła (CPXV) z aktywacją NF- $\kappa$ B

Do użytecznych modeli służących do badań nad szczepionką przeciwospową zalicza się również wirus ospy bydła, CPXV. Zgodnie z rekomendacją Europejskiej Agencji Leków (European Medicines Agency, EMA), szczepionka taka powinna wykazywać skuteczność przeciwko dwóm, innym niż VACV, patogenom należącym do ortopokswirusów. Przed przystąpieniem do prób klinicznych, badania nad szczepionką przeprowadza się na myszach szczepu BALB/c, a jej skuteczność testuje się na małpach, ponieważ do testów takich zaleca się użycie dwóch różnych gatunków ssaków, przy czym początkowa faza doświadczeń powinna być przeprowadzona na modelu zwierzęcia nie należącego do naczelnych [26]. Opracowanie skutecznej szczepionki przeciwospowej przysparza wiele problemów, dlatego opracowuje się nowe modele zakażenia, takie jak, wprowadzony w ostatnich latach myszy model wewnątrznosowego zakażenia CPXV (szczep Brighton). Pomimo iż aktualna wiedza na temat CPXV jako patogenu modelowego jest, w porównaniu z VACV czy ECTV, wciąż niewielka, to model ten wydaje się być wartościowy. W odróżnieniu od ECTV, gdzie wirus wprowadzany jest dostopowo, zakażenie CPXV przeprowadza się wewnątrznosowo, co jest równie skuteczne, jak aerozolizacja. Dodatkowo, CPXV jest wysoce wirulentny dla myszy, a zakażenia nim spowodowane skutkują procesem chorobowym, a nawet zejściem śmiertelnym u ludzi [35]. CPXV, patogen o jednym z największych genomów w obrębie rodzaju *Orthopoxvirus* (~224–228 kbp), ma również prawdopodobnie najszerszy spośród wszystkich wirusów z tej grupy zakres gospodarza i uważany jest, obok MPXV, za główne źródło potencjalnych zakażeń ortopokswirusowych u ludzi [4, 28]. Rezerwuarem CPXV są niektóre gryzonie, które mogą zarażać zwierzęta w zoo lub koty, przenoszące wirusa na człowieka [77]. Zakażenia CPXV obserwuje się także u krów,



u których powoduje on powstanie owrzodzeń strzyków, a kontakt dojarzy z zakażonymi zwierzętami doprowadza do wystąpienia zmian w postaci krost na dłoniach. Zakażenia CPXV u ludzi, po około 7 dniach inkubacji, powodują nagle wystąpienie gorączki, bólu głowy i mięśni. Objawom tym towarzyszą występujące powszechnie na rękach i twarzy zmiany skórne, a także lokalne powiększenie węzłów chłonnych. Zmiany skórne ustępują w ciągu kilku tygodni, pozostawiając blizny. Jak już wspomniano, choroba ta może kończyć się śmiercią [88].

CPXV, podobnie jak inne ortopokswirusy, ma zdolność do interferencji ze szlakami metabolicznymi komórki, które prowadzą do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. W doświadczeniach polegających na stymulacji TNF- $\alpha$  bądź kwasem okadaikowym (ocadaic acid, OA) komórek zakażonych CPXV, stwierdzono indukcję fosforylacji I $\kappa$ B $\alpha$ , który nie ulegał jednak degradacji. Zaobserwowano również stopniową redukcję ilości indukowanego TNF- $\alpha$  jądrowego NF- $\kappa$ B (dimery p65/p50), który może wiązać oligonukleotydy zawierające miejsce wiązania  $\kappa$ B. Wykazano także udział wczesnych genów wirusowych w zjawisku interferencji CPXV z translokacją NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego oraz zaobserwowano, że wirus ten specyficznie hamuje ekspresję genów regulowanych przez NF- $\kappa$ B [65].

Za zdolność CPXV do hamowania aktywności TNF odpowiadają białka: CrmB, C, D i E [45, 53, 74, 82], a także, występujący m. in. u CPXV i ECTV, wirusowy receptor CD30 wiążący CD153 (viral CD30, vCD30). vCD30 CPXV zawiera sekwencję o długości 58 aa, która wykazuje podobieństwo z obszarami wiążącymi ligand zarówno mysiego (59%), jak i ludzkiego (51%) CD30 oraz może wiązać mysie i ludzkie CD153 [3, 67, 75]. Jako że CD30 należy do nadrodziny receptorów TNF i jest aktywatorem NF- $\kappa$ B, to dzięki wirusowemu odpowiednikowi tego białka, CPXV może pośrednio oddziaływać na aktywację NF- $\kappa$ B. W podobny sposób patogen ten wpływa na IL-1 $\beta$ , której rozpuszczalny receptor jest produktem genu CPXV [11, 87]. CPXV koduje również, wspomniane wcześniej, białko wiążące IL-18 [85].

W ostatnich latach zidentyfikowano inne białka CPXV wykazujące zdolność do interferencji z aktywacją NF- $\kappa$ B. Jednym z nich jest CP77, które zawiera 9 hipotetycznych powtórzeń ankirynowych oraz C-terminalną domenę o strukturze podobnej do F-box. Struktury te ułatwiają wiązanie tego białka z NF- $\kappa$ B/p65 i kompleksem ligazy ubikwityny E3 typu SCF (Skp-Cullin-F-box). Sugeruje się, iż CP77 służy jako pomost łączący NF- $\kappa$ B i SCF, co umożliwia ubikwitynację i degradację NF- $\kappa$ B w proteasomie. Białko CP77 może być również uznane za podobną do I $\kappa$ B domenę zastępczą, która zakłóca translokację NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego. Wykazano także, iż CP77 jest zdolne do blokowania aktywacji NF- $\kappa$ B indukowanej przez IL-1 lub TNF po stymulacji IKK [18]. Analiza genomu CPXV wykazała

również obecność genu kodującego homolog białka VARV G1R [59], który zawiera 6 N-terminalnych powtórzeń ankirynowych. Białko to, nazwane CPXV-006 wykazuje także zdolność do interakcji i interferencji z degradacją NF- $\kappa$ B/p105, przez co zapobiega uwalnianiu i migracji NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego. Wykazano również, iż CPXV-006 działa powyżej IKK, a delecja genu kodującego to białko przywraca fosforylację IKK i aktywację oraz lokalizację jądrową NF- $\kappa$ B w zakażonych komórkach. Zakażenie komórek linii THP1 CPXV z defektywnym genem białka CPXV-006 skutkowało gwałtowną aktywacją dużych ilości różnych cytokin prozapalnych, których ekspresja podlega regulacji przez NF- $\kappa$ B [61].

W genomie CPXV obecny jest również ortolog genu białka K1L VACV. Produkt tego genu zawiera 6 powtórzeń ankirynowych i wykazuje 96% podobieństwo do K1L, które interferuje z aktywacją NF- $\kappa$ B dzięki przeciwdziałaniu degradacji I $\kappa$ B $\alpha$  [60]. Ponadto stwierdzono, iż CPXV koduje jeszcze kilka innych białek zawierających powtórzenia ankirynowe, jednakże ich funkcja nie została jeszcze poznana. Być może, podobnie jak inne ortopokswirusowe białka tego typu, pełnią one funkcje immunomodulatorowe [4].

## 7. Podsumowanie

Podczas zakażeń ortopokswirusowych dochodzi do zmian aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. W niniejszej pracy omówiono to zagadnienie w odniesieniu do modelowych ortopokswirusów, to jest VACV, ECTV i CPXV, gdyż wiedza na temat ich wpływu na aktywność NF- $\kappa$ B, który jest centralnym regulatorem odpowiedzi przeciwzakaźnej o wielokierunkowym działaniu, może pomóc zrozumieć skutki oddziaływania wirusa na metabolizm komórki oraz mechanizmy patogenyzy ospy prawdziwej oraz innych chorób wirusowych. Lepsze poznanie mechanizmów aktywacji NF- $\kappa$ B i jego roli podczas zakażenia wirusowego umożliwi z kolei opracowanie efektywnej terapii nakierowanej na kontrolę poziomu ekspresji tego czynnika w komórce oraz może przyczynić się do opracowania skutecznych szczepionek przeciwwirusowych, w tym przeciwko ospie prawdziwej.

### Wykaz użytych skrótów:

**ANK**, powtórzenia ankirynowe (ankyrin repeats); **BAFFR**, receptor czynnika aktywującego limfocyty B (B cell activating factor receptor); **CMV**, cytomegalowirus (cytomegalovirus); **CPXV**, wirus ospy bydła (cowpox virus); **Crm**, białko modyfikujące odpowiedź cytokinową (cytokine response modifier); **CTL**, limfocyty T cytotoksyczne (cytotoxic T lymphocytes); **d.p.z.**, dni po zakażeniu; **DEDS**, domeny efektorowe śmierci (death effector domains); **DLN**, miejscowe węzły chłonne (draining lymph nodes); **ECTV**, wirus ospy myszy (ektromelii; ectromelia virus); **ECTV-MOS**,

ECTV szczep Moscow (ECTV Moscow strain); **ECTV-NAV**, ECTV szczep Naval (ECTV Naval strain); **eIF-2 $\alpha$** , podjednostka  $\alpha$  eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2 ( $\alpha$  subunit of eukaryotic translation initiation factor-2); **EMA**, Europejska Agencja Leków (European Medicines Agency); **ER**, retikulum endoplazmatyczne (endoplasmic reticulum); **ERK2**, kinaza aktywowana zewnątrzkomórkowo 2 (extracellular regulated kinase 2); **HBV**, wirus zapalenia wątroby typu B (hepatitis B virus); **HCV**, wirus zapalenia wątroby typu C (hepatitis C virus); **HHV-1/HSV-1**, wirus opryszczki pospolitej (human herpesvirus 1/herpes simplex virus 1); **HIV**, ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus); **HIV-1**, HIV typu 1 (HIV type 1); **HPV**, wirus brodawczaka ludzkiego (human papillomavirus); **HRMs**, modyfikatory mechanizmów odpornościowych gospodarza (host response modifiers); **HTLV-1**, ludzki wirus białaczki T-limfocytarnej typu 1 (human T-cell leukemia virus type 1); **IFN**, interferon (interferon); **IKK**, kinaza I $\kappa$ B (I $\kappa$ B kinase); **IL-18BPs**, białka wiążące IL-18 (IL-18 binding proteins); **I $\kappa$ B $\alpha$** , inhibitor  $\kappa$ B $\alpha$  (inhibitor  $\kappa$ B $\alpha$ ); **LPS**, lipopolisacharydy (lipopolysaccharides); **LT $\beta$ R**, receptor limfotoksyny  $\beta$  (lymphotoxin  $\beta$  receptor); **MCV**, wirus mięczaka zakaźnego (molluscum contagiosum virus); **MHC-I**, główny układ zgodności tkankowej klasy I (major histocompatibility complex class I); **MPXV**, wirus ospy małp (monkeypox virus); **MVA**, zmodyfikowany wirus krowianki szczep Ankara (modified vaccinia virus Ankara); **MYXV**, wirus myksomatozy (myxoma virus); **NF- $\kappa$ B**, czynnik jądrowy  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B); **NIK**, kinaza aktywująca NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B-inducing kinase); **NK**, „naturalni zabójcy” (natural killers); **NLS**, sygnał lokalizacji jądrowej (nuclear localization signal); **OA**, kwas okadaikowy (ocadaic acid); **ORFs**, otwarte ramki odczytu (open reading frames); **OUN**, ośrodkowy układ nerwowy; **PAMPs**, molekularne wzorce patogenności (pathogen-associated molecular patterns); **PEST**, prolina, kwas glutaminowy, seryna i treonina (proline, glutamic acid, serine, and threonine); **PKR**, kinaza białkowa R (protein kinase R); **PMA**, 12-mirystrynian, 13-octan forbolu (phorbol 12-myristate 13-acetate); **PYD**, domena PYRIN (PYRIN domain); **RHD**, domena homologiczna Rel (Rel homology domain); **SCF**, ligaza ubikwityny zawierająca białka Skp1, Cullin-1 i F-box (Skp-Cullin-F-box); **TAD**, domena transaktywująca (transactivation domain); **TIR**, receptor Toll/IL-1 (Toll/IL-1 receptor); **TLRs**, receptory Toll-podobne (Toll-like receptors); **TNF- $\alpha$** , czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ); **TRAF**, czynnik związany z receptorem TNF (TNF receptor-associated factor); **TRIP**, białko oddziałujące z TRAF (TRAF-interacting protein); **VACV**, wirus krowianki (vaccinia virus); **VACV-WR**, VACV szczep Western Reserve (VACV strain Western Reserve); **VARV**, wirus ospy prawdziwej (variola virus); **vCC-CKBP**, wirusowe białko wiążące chemokiny typu CC (viral CC chemokine-binding protein); **vCD30**, wirusowy receptor CD30 (viral CD30); **vIFN- $\gamma$ R**, wirusowy receptor IFN- $\gamma$  (viral IFN- $\gamma$  receptor); **vIL1 $\beta$ R**, wirusowy receptor interleukiny 1 $\beta$  (viral IL-1 $\beta$  receptor); **vTNFR**, wirusowy receptor TNF (viral TNF receptor); **WHO**, Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization)

## Piśmiennictwo

- Aizawa Y., Akita K., Taniai M., Torigoe K., Mori T., Nishida Y., Ushio S., Nukada Y., Tanimoto T., Ikegami H., Ikeda M., Kurimoto M.: Cloning and expression of interleukin-18 binding protein. *FEBS Lett.* **445**, 338–342 (1999)
- Alcami A., Smith G.L.: A soluble receptor for interleukin-1 $\beta$  encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell*, **71**, 153–167 (1992)
- Alejo A., Saraiva M., Ruiz-Argüello M.B., Viejo-Borbolla A., de Marco M.F., Salguero E.J., Alcami A.: A method for the generation of ectromelia virus (ECTV) recombinants: *in vivo* analysis of ECTV vCD30 deletion mutants. *PLoS One*, **4**, e5175 (2009)
- Alzhanova D., Früh K.: Modulation of the host immune response by cowpox virus. *Microbes Infect.* **12**, 900–909 (2010)
- Andrewes C.H., Elford W.J.: Infectious ectromelia; experiments on interference and immunization. *Br. J. Exp. Pathol.* **28**, 278–285 (1947)
- Barnes P.J., Karin M.: Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1066–1071 (1997)
- Barry M., Wasilenko S.T., Stewart T.L., Taylor J.M.: Apoptosis regulator genes encoded by poxviruses. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **36**, 19–37 (2004)
- Beg A.A., Sha W.C., Bronson R.T., Ghosh S., Baltimore D.: Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- $\kappa$ B. *Nature*, **376**, 167–170 (1995)
- Berche P.: The threat of smallpox and bioterrorism. *Trends Microbiol.* **9**, 15–18 (2001)
- Bergqvist S., Ghosh G., Komives E.A.: The I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B complex has two hot spots, one at either end of the interface. *Protein Sci.* **17**, 2051–2058 (2008)
- Biswas P., Smith C.A., Goletti D., Hardy E.C., Jackson R.W., Fauci A.S.: Cross-linking of CD30 induces HIV expression in chronically infected T cells. *Immunity*, **2**, 587–596 (1995)
- Born T.L., Morrison L.A., Esteban D.J., VandenBos T., Thebeau L.G., Chen N., Spriggs M.K., Sims J.E., Buller R.M.L.: A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. *J. Immunol.* **164**, 3246–3254 (2000)
- Bowie A., Kiss-Toth E., Symons J.A., Smith G.L., Dower S.K., O'Neill L.A.J.: A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10162–10167 (2000)
- Brick D.J., Burke R.D., Minkley A.A., Upton C.: Ectromelia virus virulence factor p28 acts upstream of caspase-3 in response to UV light-induced apoptosis. *J. Gen. Virol.* **81**, 1087–1097 (2000)
- Brivanlou A.H., Darnell J.E. Jr.: Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, **295**, 813–818 (2002)
- Buller R.M.L., Owens G., Schriewer J., Melman L., Beadle J.R., Hostetler K.Y.: Efficacy of oral active ether lipid analogs of cidofovir in a lethal mousepox model. *Virology*, **318**, 474–481 (2004)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Laboratory-acquired vaccinia exposures and infections—United States, 2005–2007. *MMWR*, **57**, 401–404 (2008)
- Chang S.J., Hsiao J.C., Sonnberg S., Chiang C.T., Yang M.H., Tzou D.L., Mercer A.A., Chang W.: Poxvirus host range protein CP77 contains an F-box-like domain that is necessary to suppress NF- $\kappa$ B activation by tumor necrosis factor  $\alpha$  but is independent of its host range function. *J. Virol.* **83**, 4140–4152 (2009)
- Chandhri G., Panchanathan V., Buller R.M.L., van den Eertwegh A.J., Claassen E., Zhou J., de Chazal R., Laman J.D., Karupiah G.: Polarized type 1 cytokine response and cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9057–9062 (2004)
- Chen F., Castranova V., Shi X., Demers L.M.: New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* **45**, 7–17 (1999)
- Chen N., Buller R.M.L., Wall E.M., Upton C.: Analysis of host response modifier ORFs of ectromelia virus, the causative agent of mousepox. *Virus Res.* **66**, 155–173 (2000)
- Chen R.A.J., Jacobs N., Smith G.L.: Vaccinia virus strain Western Reserve protein B14 is an intracellular virulence factor. *J. Gen. Virol.* **87**, 1451–1458 (2006)

23. Chen R.A.J., Ryzhakov G., Cooray S., Randow F., Smith G.L.: Inhibition of I $\kappa$ B kinase by vaccinia virus virulence factor B14. *PLoS Pathog.* **4**, e22 (2008)
24. Chu W.M., Ostertag D., Li Z.W., Chang L., Chen Y., Hu Y., Williams B., Perrault J., Karin M.: JNK2 and IKK $\beta$  are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*, **11**, 721–731 (1999)
25. DeJardin E.: The alternative NF- $\kappa$ B pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1161–1179 (2006)
26. EMEA: Note for guidance on the development of vaccinia virus based vaccines against smallpox (2002)
27. Espinosa L., Bigas A., Mulero M.C.: Alternative nuclear functions for NF- $\kappa$ B family members. *Am. J. Cancer Res.* **1**, 446–459 (2011)
28. Esposito J.J., Knight J.C.: Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology*, **143**, 230–251 (1985)
29. Essbauer S., Pfeffer M., Meyer H.: Zoonotic poxviruses. *Vet. Microbiol.* **140**, 229–236 (2010)
30. Esteban D.J., Buller R.M.L.: *Ectromelia virus*: the causative agent of mousepox. *J. Gen. Virol.* **86**, 2645–2659 (2005)
31. Esteban D.J., Nuara A.A., Buller R.M.L.: Interleukin-18 and glycosaminoglycan binding by a protein encoded by *Variola virus*. *J. Gen. Virol.* **85**, 1291–1299 (2004)
32. Fagan-Garcia K., Barry M.: A vaccinia virus deletion mutant reveals the presence of additional inhibitors of NF- $\kappa$ B. *J. Virol.* **85**, 883–894 (2011)
33. Fenner F., Mousepox (w) *The Mouse in Biomedical Research*, red. H.L. Foster, J.D. Small, J.G. Fox, Academic Press, New York, 1982, t. II, s. 209–230.
34. Fenner F.: Mousepox (infectious ectromelia): past, present, and future. *Lab. Anim. Sci.* **31**, 553–559 (1981)
35. Ferrier-Rembert A., Drillien R., Tournier J.N., Garin D., Crance J.M.: Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines. *Vaccine*, **25**, 4809–4817 (2007)
36. Gedey R., Jin X.L., Hinthong O., Shisler J.L.: Poxviral regulation of the host NF- $\kappa$ B response: the vaccinia virus M2L protein inhibits induction of NF- $\kappa$ B activation via an ERK2 pathway in virus-infected human embryonic kidney cells. *J. Virol.* **80**, 8676–8685 (2006)
37. Ghosh S., Karin M.: Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell*, **109**, 81–96 (2002)
38. Gil J., Alcamí J., Esteban M.: Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the  $\alpha$  subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF- $\kappa$ B. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4653–4663 (1999)
39. Gilmore T.D., Ip Y.T., Signal transduction pathways in development and immunity: NF $\kappa$ B/Rel pathways (w) eLS, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2009
40. Gubser C., Hué S., Kellam P., Smith G.L.: Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.* **85**, 105–117 (2004)
41. Guerin J.L., Gelfi J., Boullier S., Delverdier M., Bellanger F.A., Bertagnoli S., Drexler I., Sutter G., Messud-Petit F.: Myxoma virus leukemia-associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins. *J. Virol.* **76**, 2912–2923 (2002)
42. Guerra S., López-Fernández L.A., Conde R., Pascual-Montano A., Harshman K., Esteban M.: Microarray analysis reveals characteristic changes of host cell gene expression in response to attenuated modified vaccinia virus Ankara infection of human HeLa cells. *J. Virol.* **78**, 5820–5834 (2004)
43. Hinthong O., Jin H.L., Shisler J.L.: Characterization of wild-type and mutant vaccinia virus M2L proteins' abilities to localize to the endoplasmic reticulum and to inhibit NF- $\kappa$ B activation during infection. *Virology*, **373**, 248–262 (2008)
44. Hiscott J., Kwon H., Génin P.: Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- $\kappa$ B pathway. *J. Clin. Invest.* **107**, 143–151 (2001)
45. Hu F.Q., Smith C.A., Pickup D.J.: Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology*, **204**, 343–356 (1994)
46. 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.* **21**, 4737–4747 (2001)
47. Johnston J.B., McFadden G.: Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. *J. Virol.* **77**, 6093–6100 (2003)
48. Kaufman R.J.: Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11693–11695 (1999)
49. Krzyżowska M., Polańczyk M., Baś M., Cymerys J., Schollenberger A., Chiodi F., Niemiałowski M.: Mousepox conjunctivitis: the role of Fas/FasL mediated apoptosis of epithelial cells in virus dissemination. *J. Gen. Virol.* **86**, 2007–2018 (2005)
50. Kumar A., Haque J., Lacoste J., Hiscott J., Williams B.R.: Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF- $\kappa$ B by phosphorylating I $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6288–6292 (1994)
51. Lawrence T.: The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a001651 (2009)
52. Lefkowitz E.J., Wang C., Upton C.: Poxviruses: past, present, and future. *Virus Res.* **117**, 105–118 (2006)
53. Loparev V.N., Parsons J.M., Knight J.C., Panus J.F., Ray C.A., Buller R.M.L., Pickup D.J., Esposito J.J.: A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3786–3791 (1998)
54. Lynch H.E., Ray C.A., Oie K.L., Pollara J.J., Petty I.T.D., Sadler A.J., Williams B.R.G., Pickup D.J.: Modified vaccinia virus Ankara can activate NF- $\kappa$ B transcription factors through a double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-dependent pathway during the early phase of virus replication. *Virology*, **391**, 177–186 (2009)
55. Mahy B.W.J., A dictionary of virology. Academic Press. San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 2001, s. 314.
56. Mansouri M., Bartee E., Gouveia K., Hovey Nerenberg B.T., Barrett J., Thomas L., Thomas G., McFadden G., Fruh K.: The PHD/LAP-domain protein M153R of myxomavirus is a ubiquitin ligase that induces the rapid internalization and lysosomal destruction of CD4. *J. Virol.* **77**, 1427–1440 (2003)
57. Martin S., Shisler J.L.: Early viral protein synthesis is necessary for NF- $\kappa$ B activation in modified vaccinia Ankara (MVA)-infected 293T fibroblast cells. *Virology*, **390**, 298–306 (2009)
58. Mogensen T.H.: Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 240–273 (2009)
59. Mohamed M.R., Rahman M.M., Lanchbury J.S., Shattuck D., Neff C., Dufford M., van Buuren N., Fagan K., Barry M., Smith S., Damon I., McFadden G.: Proteomic screening of variola virus reveals a unique NF- $\kappa$ B inhibitor that is highly conserved among pathogenic orthopoxviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9045–9050 (2009)
60. Mohamed M.R., McFadden G.: NF $\kappa$ B inhibitors: strategies from poxviruses. *Cell Cycle*, **8**, 3125–3132 (2009)
61. Mohamed M.R., Rahman M.M., Rice A., Moyer R.W., Warden S.J., McFadden G.: Cowpox virus expresses a novel ankyrin repeat NF- $\kappa$ B inhibitor that controls inflammatory cell influx into virus-infected tissues and is critical for virus pathogenesis. *J. Virol.* **83**, 9223–9236 (2009)

62. Moss B., Poxviridae: the viruses and their replication (w) Fields virology, red. D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2007, t. 2, s. 2905–2946.
63. Navarini A.A., Krzyżowska M., Lang K.S., Horvath E., Hengartner H., Niemiałtowski M.G., Zinkernagel R.M.: Long lasting immunity by early infection of maternal-antibody protected infants. *Eur. J. Immunol.* **39**, 3052–3065 (2009)
64. Niemiałtowski M., Szulc L., Boratyńska A., Martyniszyn L., Struzik J., Karandys J.: Ospa prawdziwa: patrząc wstecz do Edwarda Jennera, a nawet trochę dalej. *Post. Mikrobiol.* **48**, 289–298 (2009)
65. Oie K.L., Pickup D.J.: Cowpox virus and other members of the orthopoxvirus genus interfere with the regulation of NF- $\kappa$ B activation. *Virology*, **288**, 175–187 (2001)
66. Pahl H.L.: Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6853–6866 (1999)
67. Panus J.F., Smith C.A., Ray C.A., Smith T.D., Patel D.D., Pickup D.J.: Cowpox virus encodes a fifth member of the tumor necrosis factor receptor family: a soluble, secreted CD30 homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8348–8353 (2002)
68. PBR (online). <http://www.poxvirus.org/viruses.asp> (06.06.2012 r.)
69. Perkins N.D.: The Rel/NF- $\kappa$ B family: friend and foe. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 434–440 (2000)
70. Rajagopal N.A., Hu S., Lokensgard J.R.: Inhibition of Toll-like receptor signaling in primary murine microglia. *J. Neuro-immune Pharmacol.* **3**, 5–11 (2008)
71. Ray C.A., Black R.A., Kronheim S.R., Greenstreet T.A., Sleath P.R., Salvesen G.S., Pickup D.J.: Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Cell*, **69**, 597–604 (1992)
72. Ribas G., Rivera J., Saraiva M., Campbell R.D., Alcami A.: Genetic variability of immunomodulatory genes in ectromelia virus isolates detected by denaturing high-performance liquid chromatography. *J. Virol.* **77**, 10139–10146 (2003)
73. Rupec R.A., Poujol D., Grosgeorge J., Carle G.F., Livolsi A., Peyron J.F., Schmid R.M., Baeuerle P.A., Messer G.: Structural analysis, expression, and chromosomal localization of the mouse *ikba* gene. *Immunogenetics*, **49**, 395–403 (1999)
74. Saraiva M., Alcami A.: CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *J. Virol.* **75**, 226–233 (2001)
75. Saraiva M., Smith P., Fallon P.G., Alcami A.: Inhibition of type 1 cytokine-mediated inflammation by a soluble CD30 homologue encoded by ectromelia (mousepox) virus. *J. Exp. Med.* **196**, 829–839 (2002)
76. Schmitz M.L., Baeuerle P.A.: The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF- $\kappa$ B. *EMBO J.* **10**, 3805–3817 (1991)
77. Schulze C., Alex M., Schirrmeier H., Hlinak A., Engelhardt A., Koschinski B., Beyreiss B., Hoffmann M., Czerny C.P.: Generalized fatal Cowpox virus infection in a cat with transmission to a human contact case. *Zoonoses Public Health*, **54**, 31–37 (2007)
78. Sen R., Baltimore D.: Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, **46**, 705–716 (1986)
79. Shchelkunov S.N.: Immunomodulatory proteins of orthopoxviruses. *Mol. Biol.* **37**, 37–48 (2003)
80. Shisler J.L., Jin X.L.: The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF- $\kappa$ B activation by preventing I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. *J. Virol.* **78**, 3553–3560 (2004)
81. Silva D.C., Moreira-Silva E.A., Gomes Jde A., Fonseca F.G., Correa-Oliveira R.: Clinical signs, diagnosis, and case reports of Vaccinia virus infections. *Braz. J. Infect. Dis.* **14**, 129–134 (2010)
82. Smith C.A., Hu F.Q., Smith T.D., Richards C.L., Smolak P., Goodwin R.G., Pickup D.J.: Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT $\alpha$ . *Virology*, **223**, 132–147 (1996)
83. Smith V.P., Alcami A.: Expression of secreted cytokine and chemokine inhibitors by ectromelia virus. *J. Virol.* **74**, 8460–8471 (2000)
84. Smith V.P., Alcami A.: Inhibition of interferons by ectromelia virus. *J. Virol.* **76**, 1124–1134 (2002)
85. Smith V.P., Bryant N.A., Alcamí A.: Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins. *J. Gen. Virol.* **81**, 1223–1230 (2000)
86. Spohr Cespedes I., Toka E.N., Schollenberger A., Gieryńska M., Niemiałtowski M.: Pathogenesis of mousepox in H-2<sup>d</sup> mice: evidence for MHC class I-restricted CD8<sup>+</sup> and MHC class II-restricted CD4<sup>+</sup> CTL antiviral activity in the lymph nodes, spleen and skin, but not in the conjunctivae. *Microbes Infect.* **3**, 1063–1072 (2001)
87. Spriggs M.K., Hruby D.E., Maliszewski C.R., Pickup D.J., Sims J.E., Buller R.M.L., VanSlyke J.: Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell*, **71**, 145–152 (1992)
88. Steinberg A.D.: Recent worldwide research on animal pox viruses. Open Source Center, MITRE Corp., January 2008
89. Sutter G., Staib C.: Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **3**, 263–271 (2003)
90. Symons J.A., Adams E., Tschärke D.C., Reading P.C., Waldman H., Smith G.L.: The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model. *J. Gen. Virol.* **83**, 2833–2844 (2002)
91. Szulc L., Boratyńska A., Martyniszyn L., Niemiałtowski M.G.: Antigen presenting and effector cell cluster formation in BALB/c mice during mousepox: model studies. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 1817–1828 (2010)
92. Turner S.J., Silke J., Kenshole B., Ruby J.: Characterization of the ectromelia virus serpin, SPI-2. *J. Gen. Virol.* **81**, 2425–2430 (2000)
93. Willis K.L., Langland J.O., Shisler J.L.: Viral dsRNAs from vaccinia virus early or intermediate gene transcripts possess PKR activating function, resulting in NF- $\kappa$ B activation, when the K1 protein is absent or mutated. *J. Biol. Chem.* **286**, 7765–7778 (2011)
94. World Health Organization, The Global Eradication of Smallpox. Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication. History of International Public Health No. 4. Geneva, World Health Organization, 1980.

Pracę wykonano w ramach grantu promotorskiego N N308 573740 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Warszawie. Justyna Struzik – Doktorantka z dziennego studium doktoranckiego „Ksenobiotyki oraz biologia czynników zakaźnych i inwazyjnych” przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie (kierownik studium i promotor: prof. dr hab. Marek Niemiałtowski)