

Celem projektu jest zbadanie wpływu wirusa ospy myszy (ektromelii, ECTV, *ectromelia virus*) na niekanoniczny szlak aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego κ B (NF- κ B, *nuclear factor κ B*) w komórkach nabłonkowych, fibroblastach i makrofagach *in vitro*. Niegroźny dla człowieka wirus ospy myszy stał się cennym narzędziem do badań dotyczących innych, blisko z nim spokrewnionych, bo należących do tego samego rodzaju *Orthopoxvirus* i rodziny *Poxviridae* wirusów, które mogą wywołać groźne dla człowieka choroby odzwierzęce. Wirus, który wnika do komórki, wykorzystuje rozmaite strategie mające na celu jego skuteczne powielenie się. Dotychczasowe badania nad mechanizmami modyfikacji odpowiedzi na zakażenie ortopokswirusowe koncentrowały się na wpływie wirusów z tego rodzaju na kanoniczną kaskadę aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który jest istotny dla wrodzonych mechanizmów odpowiedzi przeciwwirusowej. Wirusy te skutecznie zapobiegają jego stymulacji, a tym samym unikają aktywacji wrodzonych mechanizmów odpowiedzi przeciwwirusowej. Zaskakujący jest fakt, iż niedawno wykazano, że niekanoniczny szlak aktywacji NF- κ B jest również zaangażowany we wrodzone mechanizmy odporności przeciwwirusowej. Biorąc pod uwagę tę nowopoznaną rolę niekanonicznego szlaku aktywacji NF- κ B, a także fakt przenikania się kanonicznego i niekanonicznego szlaku sygnałowego NF- κ B przypuszczamy, iż ECTV moduluje aktywację komponentów niekanonicznego szlaku aktywacji NF- κ B.

W naszych doświadczeniach wykorzystane zostaną ludzkie komórki nabłonkowe linii HeLa, mysie fibroblasty zarodkowe MEFs i mysie makrofagi RAW 264.7, które są wrażliwe na zakażenie ECTV. Analizowane komórki będą zakażane wysoce zakaźnym szczepem Moscow ECTV (ECTV-MOS), ECTV-MOS inaktywowanym promieniami UV lub pozostaną niezakażone. Dodatkowo zakażone i niezakażone komórki będą poddane stymulacji induktorami niekanonicznego szlaku aktywacji NF- κ B, takimi jak interferon γ (IFN- γ , *interferon- γ*), lipopolisacharyd (LPS, *lipopolysaccharide*), limfotoksyna β (LT- β , *lymphotoxin β*), czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α , *tumor necrosis factor- α*), lub 13-octan-12-O-tetradekanoilo-forbolu (TPA, *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*). W 4, 8, 12, 18 i 24 godzinie po zakażeniu (g.p.z.), komórki zostaną utrwalone lub zebrane do dalszej analizy. W celu uwidocznienia lokalizacji antygenów ECTV oraz białek niekanonicznego szlaku aktywacji NF- κ B, takich jak komórkowe inhibitory apoptozy 1 i 2 (cIAP1/2, *cellular inhibitor of apoptosis 1/2*), białka adaptorowe związane z receptorem TNF 2 i 3 (TRAF2/3, *TNF receptor-associated factor 2/3*), kinaza aktywująca NF- κ B (NIK, *NF- κ B-inducing kinase*), podjednostka α kinazy inhibitora κ B (IKK α , *inhibitor κ B kinase α subunit*) i RelB w komórce, zostanie wykorzystana analiza immunofluorescencyjna. Do oceny poziomu białek cIAP1/2, TRAF2/3, NIK, IKK α , p100/p52, fosfo-p100 i RelB w ekstraktach komórkowych oraz we frakcjach jądrowych i cytoplazmatycznych zostanie wykorzystana metoda Western Blot i chemiluminescencja. Wiązanie DNA przez podjednostki NF- κ B RelB i p52 zostanie ocenione przy użyciu testu DNA-binding ELISA z wykorzystaniem analizy kolorymetrycznej. W celu oceny poziomu ekspresji genów kodujących białka niekanonicznego szlaku NF- κ B i ulegających ekspresji w odpowiedzi na aktywację niekanonicznego szlaku NF- κ B, zostanie przeprowadzona analiza metodą real-time PCR.

Pomimo spektakularnego sukcesu kampanii szczepień Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*), ospa prawdziwa wywoływana przez wirus ospy prawdziwej (VARV, *variola virus*), który jest blisko spokrewniony z ECTV, jest wciąż uznawana za zagrożenie dla ludzi w związku z możliwością użycia VARV jako broni biologicznej. Co więcej, wykorzystanie wirusa krowianki (VACV, *vaccinia virus*) jako szczepionki przeciwko ospie prawdziwej, co zapewniało ochronę przed innymi chorobami ortopokswirusowymi, nie jest już stosowane, stąd VACV wraz z wirusem ospy krów (CPXV, *cowpox virus*) i wirusem ospy małp (MPXV, *monkeypox virus*) stanowią obecnie czynniki wywołujące zoonozy, które mogą prowadzić do śmierci. Stąd, badania nad patogenezą zakażeń ortopokswirusowych są nadal konieczne.

Badania nad wpływem zakażenia ECTV na aktywację komponentów niekanonicznego szlaku aktywacji NF- κ B mają charakter nowatorski i umożliwią wskazanie potencjalnych celów wirusowej manipulacji. Badanie wpływu wirusów na szlaki sygnałowe komórki może ułatwić identyfikację celów terapeutycznych oraz tworzenie szczepionek. Ważne jest, iż zdolności pokswirusów do immunomodulacji mogą zostać wykorzystane do zahamowania niepożądanego odpowiedzi ze strony układu odpornościowego, która jest znamienitą cechą chorób autoimmunizacyjnych i procesu odrzucania przeszczepu.