

# *Alergia*

# *Astma*

# *Immunologia*

## *przeegląd kliniczny*

IMPACT  
FACTOR

0.2

PUNKTY  
MEIN

20

Index  
Copernicus  
Value

101.15

### ARTYKUŁY ORYGINALNE

Production of crud allergen extract from *Aspergillus fumigatus* and recombinant Asp f 1 in *Escherichia coli*, and compare their immunological characterization

Ludzki rinowirus RV-16 hamuje syntezę i uwalnianie TSLP w komórkach śródbłonna naczyniowego płuc

Generowanie odpowiedzi zapalnej i przeciwwirusowej przez komórki śródbłonna naczyń płucnych w odpowiedzi na stymulację receptora TLR3

## Redakcja



dr hab. n med. Maciej Chałubiński, prof. UM  
Redaktor naczelny



mgr Izabela Gulbas  
Sekretarz redakcji



dr n. biol. Adrian Bekier  
Skład

## Słowo od redaktora naczelnego

Szanowni Czytelnicy i Czytelniczki,

oddajemy w Państwa ręce kolejny numer Kwartalnika Alergia Astma Immunologia – przegląd kliniczny.

Dominują w nim dwa obszary tematyczne obejmujące kwestie związane z uczuleniem na zarodniki grzybów pleśniowych oraz potencjału ludzkiego śródbłonka naczyniowego płuc do generowania odpowiedzi przeciwwirusowej wobec infekcji rinowirusem. Zarodniki grzybów pleśniowych uznaje się za jeden z istotnych alergenów wziewnych mogących stać się czynnikiem sprawczym rozwoju astmy, alergicznego nieżytu nosa czy przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. Spośród nich ważne znaczenie kliniczne ma *Aspergillus fumigatus*. Ekstrakt z niego zwykle wykorzystuje się do punktowych testów skórnych (SPT). Wyniki przedstawione w pierwszej pracy wykazały, że wykorzystanie rekombinowanych alergenów jako alternatywy dla surowych ekstraktów alergenów może zwiększyć skuteczność i swoistość w wykrywaniu wrażliwości na alergeny *Aspergillus*. W drugiej publikacji autorzy wykazali, iż zakażenie komórek śródbłonka naczyniowego płuc rinowirusem HRV16 wiąże się z osłabieniem wydzielania TSLP (limfopoetyna zrębu grasicy). W ostatniej pracy autorzy sugerują, że receptor TLR3 (toll-like receptor 3) odgrywa kluczową rolę w indukowaniu mechanizmów przeciwwirusowych generowanych przez śródbłonek naczyniowy. Receptor ten posiada bardzo wysoki potencjał do zwiększania ekspresji cytokin zapalnych i przeciwwirusowych. Z danych literaturowych i przeprowadzonych badań wynika także, iż komórki śródbłonka są dobrze przystosowane do rozpoznawania RNA wirusów, a w rezultacie do generowania odpowiedzi zapalnej i przeciwwirusowej w warunkach *in vitro*.

Mamy nadzieję, że opublikowane w Kwartalniku publikacje oryginalne przyczynią się do zwiększenia Państwa wiedzy w zakresie alergii na zarodniki grzybów oraz udziału śródbłonka naczyń płucnych w odpowiedzi przeciwwirusowej i zapalnej.

## Wydawca:

Stowarzyszenie Pomocy Chorym na Astmę i Choroby Alergiczne

Prezes: mgr Ewa Zielińska

V-ice Prezes: dr hab. n med. Maciej Chałubiński, prof. UM

## Adres redakcji:

ul. Pomorska 251 bud. C5, 92-213 Łódź

tel.: 42 675 73 80

e-mail: stowarzyszenie.alergia@csk.umed.lodz.pl



## ARTYKUŁY ORYGINALNY

**Production of crud allergen extract from *Aspergillus fumigatus* and recombinant Asp f 1 in *Escherichia coli*, and compare their immunological characterization.....1**

Otrzymanie ekstraktu alergenowego z *Aspergillus fumigatus* i rekombinowanego Asp f 1 w *Escherichia coli* oraz porównanie ich charakterystyki immunologicznej

*Saboura Nikpour, Hossein Safarpour, Mitra Rafiee, Mohammad Fereidouni*

**Ludzki rinowirus RV-16 hamuje syntezę i uwalnianie TSLP w komórkach śródbłonna naczyniowego płuc.....6**

Human rhinovirus RV-16 impairs TSLP synthesis and release in pulmonary vascular endothelial cells

*Kacper Leszczyński, Sylwia Moskwa, Izabela Gulbas, Maciej Chałubiński, Dorota Pastuszek-Lewandoska*

**Generowanie odpowiedzi zapalnej i przeciwwirusowej przez komórki śródbłonna naczyń płucnych w odpowiedzi na stymulację receptora TLR3.....11**

Generation of inflammatory and antiviral response by human lung endothelial cells in response to TLR 3 stimulation

*Wojciech Karpik, Izabela Gulbas, Magdalena Mikołajczyk-Chmiela, Maciej Chałubiński*

# Production of crud allergen extract from *Aspergillus fumigatus* and recombinant Asp f 1 in *Escherichia coli*, and compare their immunological characterization

Otrzymanie ekstraktu alergenowego z *Aspergillus fumigatus* i rekombinowanego Asp f 1 w *Escherichia coli* oraz porównanie ich charakterystyki immunologicznej

SABOURA NIKPOUR<sup>1</sup>, HOSSEIN SAFARPOUR<sup>2</sup>, MITRA RAFIEE<sup>3</sup>, MOHAMMAD FEREIDOUNI<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Student Research Committee, Birjand University of Medical Sciences, Iran, Birjand

<sup>2</sup> Cellular & Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Iran, Birjand

<sup>3</sup> Department of Immunology, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Science, Iran, Birjand

\* Corresponding author

## Summary

### Introduction

The prevalence of allergic diseases and asthma is increasing worldwide. Fungi have been identified as one of the most important inhalation allergens and can trigger allergic symptoms, particularly asthma, and rhinosinusitis. Among allergenic fungi, *Aspergillus fumigatus* is more important in causing allergic diseases, and its extract is usually used in skin prick tests. This study aimed to produce an allergenic extract of *Aspergillus fumigatus* and recombinant Asp f 1 in *Escherichia coli* at Birjand University of Medical Sciences.

### Material and methods

The allergenic extract of *Aspergillus fumigatus* was prepared using the standard strain. rAsp f 1 allergen was expressed in *Escherichia coli* BL21 cells and purified by Ni-NTA affinity chromatography. The amount of protein in both extracts was measured by the Bradford method. SDS-PAGE was performed to evaluate the proteins of the crude extract and the purity of rAsp f 1. Allergenicity of protein was evaluated by dot blot and ELISA compared with crude extract.

### Results

SDS-PAGE of total proteins from the crude allergen extract demonstrated several bands which included the most critical allergens of *Aspergillus fumigatus*. The recombinant protein rAsp f 1 was successfully expressed, followed by purification, and its purity was subsequently validated through SDS-PAGE. The reactivity of the two extracts with serum samples obtained from sensitized patients was confirmed through dot blot and ELISA.

### Conclusions

The results of this study demonstrated that utilizing recombinant allergens as alternatives to crude allergen extracts can enhance the efficacy and specificity in detecting sensitivity to *Aspergillus fungus*.

Key words: allergy, *Aspergillus fumigatus*, Asp f1, recombinant

© *Alergia Astma Immunologia* 2024, 29(1) 1-5

www.alergia-astma-immunologia.pl



Adres do korespondencji / Address for correspondence

Mohammad Fereidouni

Department of Immunology, Faculty of Medicine,  
Birjand University of Medical Science  
e-mail: dr.m.fereidouni@gmail.com

## 1. Introduction

Allergic diseases, such as allergic rhinitis, atopic dermatitis, and asthma, are classified as type I hyper-sensitivity reactions that are considerably increasing and affect more than 20% of the population in developed countries (1, 2). The most common triggers of allergic symptoms are plant pollen, mites, foods, fungi, and so on. Fungal allergens are important as they are responsible for allergic rhinitis, asthma, and the development of acute respiratory issues (2, 3). The incidence of sensitivity to fungal allergens is estimated to be 10 to 30 percent in the general population (4). Although many species of fungi are related to allergic diseases, the importance of fungi from the genera *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Fusarium* in causing allergies has been well confirmed (5). The importance of the *Aspergillus* species is mostly due to their high abundance and allergenicity (6). They play a critical role in bronchial diseases such as mycetoma, invasive aspergillosis, allergic bronchopulmonary aspergillosis, and type I hyper-sensitivity reactions (7). A substantial majority of diseases associated with *Aspergillus* are predominantly caused by *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) (8). The World Health Organization has classified *A. fumigatus* as a priority pathogen (9). According to a survey conducted by the Global Allergy and Asthma European Network, the prevalence of sensitivity to *A. fumigatus* varied from 0.4% in Italy to 6.9% in Portugal (10). Sensitization to *Aspergillus fumigatus* is associated with lung function deterioration in asthmatic patients (11). It is the main etiological agent of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) (8, 12). Currently, 39 allergens have been identified for *A. fumigatus* with immune reactivity, of which some, like manganese superoxide dismutase (MnSODs; Asp f 6), enolases (Asp f 22), and heat shock proteins (Asp f 12), are pan-allergens. These molecules are highly conserved in different species, leading to cross-reactivity between crude fungal extracts (13). However, Asp f 1, Asp f 2, and Asp f 4 are species-specific (14).

The protease allergens, notably Asp f 5 (MMP) and Asp f 13 (serine protease), actively secreted by *A. fumigatus*, perform a pivotal function in the recruitment of inflammatory cells and the structural reconfiguration of the airways. These proteins play a critical role in the initiation and progression of allergic asthma (15).

Asp f 1 is a major allergen of *A. fumigatus* with a molecular weight of 18 kDa (16). It was documented as a ribotoxin and shares structural and functional resemblances with  $\alpha$ -sarcin, mitogillin, and restrictocin, which are ribotoxins secreted by the nonpathogenic strains of *Aspergillus* species (17). These toxins hydrolyze the 28S rRNA of eukaryotic ribosomes and hinder protein synthesis in eukaryotic cells (18). 85% of allergic aspergillosis patients had IgE antibodies against Asp f 1 (19). Several studies found that crude fungal extracts have problems, including the presence of proteases, non-allergenic materials, a variable content of major and minor allergens, and sometimes the main allergens are not even present in the extracts (20, 21). Today, the availability of standardized extracts is needed for the diagnosis and treatment of fungal allergies (4, 22). In this regard, the production of recombinant allergens such as Asp f 1 can substantially develop diagnosis and treatment fields (23). This study aimed to produce recombinant Asp f 1 of *Aspergillus fumigatus* and

compare immunological characterization with crude allergen extract.

## 2. Material and method

### 2.1. Preparation of the Crude Extract of *Aspergillus fumigatus*

Standard strain of *Aspergillus fumigatus* (CCM F-373) was obtained from the Iranian Biological Resource Center and cultured in Sabouraud dextrose broth (SDB) medium. Mycelia were collected and suspended in Tris buffer (pH 8.0) containing an anti-protease cocktail. The mixture was flash-frozen using liquid nitrogen and subsequently pulverized by mortar and pestle. Then it was subjected to continuous stirring at 4°C for 16 h. The contents were centrifuged, and the supernatant was dialyzed against a potassium phosphate buffer (PH: 7.4, 0.1 M). The protein profile of the extract was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technique.

### 2.2. Production rAsp f 1 in *Escherichia coli*

*Escherichia coli* BL21 cells transformed with pET-22b(+) vector (Iranian Cell Gene Therapy Institute, Iran). Cells harboring plasmid were selected in ampicillin (100 ug/mL) and grown at 37°C in Luria Bertani (LB) broth medium (Merk, Germany) up to an optical density at 600 nm of 0.8. Then, the protein production was induced with 0.5 mM IPTG, and the cells were further incubated for 12 h. The cellular pellet was subjected to an osmotic shock and subsequently centrifuged. Ni-chelate affinity chromatography purified the gene product, and eluted proteins were examined on SDS-PAGE.

### 2.3. Protein Concentration Measurement

The total protein concentration in the crude allergen extract and rAsp f 1 was determined using the Bradford Protein Assay Kit (DNA Biotech, Iran). Different concentrations of bovine serum albumin (BSA) were utilized as standards.

### 2.4. Patients Selection and Serum Collection:

A list of allergic patients who visited the allergy clinic in Birjand and the level of specific IgE against 30 inhalant allergens in their blood were detected by a commercial immunoblotting kit (INTEX, Germany). Recruited from the patient registry database of Shafa Medical Laboratory. In total, the data of 210 patients was checked, and 7 patients (3.3 %) who had specific IgE against *Aspergillus* greater or equal 3.5 IU/mL were selected (Table 1).

**Table 1.** Age and gender information of patients in this study

Parameter	Index	<i>Aspergillus</i> sensitive
Age	Min	2
	MAX	75
	Mean $\pm$ SD	26.6 $\pm$ 17.1
Gender	Female	108
	Male	102
	Total (n)	210

## 2.5. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The reactivity of both recombinant (rAsp f1) and natural allergens with the sera of sensitized patients was checked.

In brief, 96-well plates were coated with the respective proteins at a concentration of 10 µg/mL in PBS (pH 7.5), anti-human IgE as a positive control, and BSA as a negative control. The plate was then incubated overnight at 4°C. Following this, a blocking step was performed using 2% skim milk. Patient serum samples were added to each well, and the bound allergens were subsequently detected using biotinylated anti-human IgE antibodies (MEDIWISS Analytic GmbH) and streptavidin conjugated to HRP. The peroxidase reaction was quantified at 450 nm using a microplate reader.

## 2.6. Dot blotting

Protein samples were transferred onto nitrocellulose membranes (pore size 0.22 µm, cytomatingene). The membranes were then blocked with 2% skim milk and incubated with serum samples for specific protein-antibody interactions. The presence of bound proteins was detected using biotinylated anti-human IgE antibodies, followed by the addition of streptavidin alkaline phosphatase for signal amplification. The blots were developed using BCIP (5-bromo-4-chloro-indoxyl-phosphate) as a chromogenic substrate for visualization. The enzymatic reaction produced a purple precipitate at the site of antibody-protein complexes. This dot blot method allowed for the qualitative assessment of protein binding to the nitrocellulose membranes.

## 3. Result

### 3.1. Culture and Morphological Characteristics

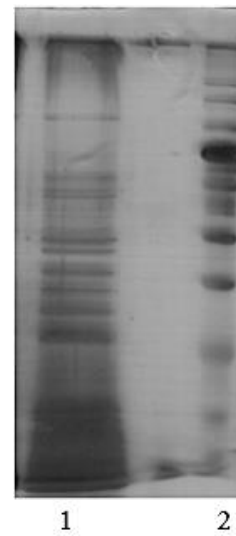
The fungal strain of *A. fumigatus* was cultured on Sabouraud dextrose agar (SDA), displaying distinctive characteristics of green conidia with a suede-like surface composed of densely packed conidiophores. Microscopic examination of *A. fumigatus* revealed smooth-walled conidiophores with septate hyphae featuring a single row of phialides present only on the upper two-thirds of the vesicle (Figure1). The protein concentrations of two extracts were determined using the Bradford method. The analysis revealed that the crude allergen extract and the rAsp f 1 were 936 µg/ml and 124 µg/ml, respectively.



**Figure 1.** *Aspergillus fumigatus* on Sabouraud dextrose agar (lactophenol cotton blue, ×100 magnification).

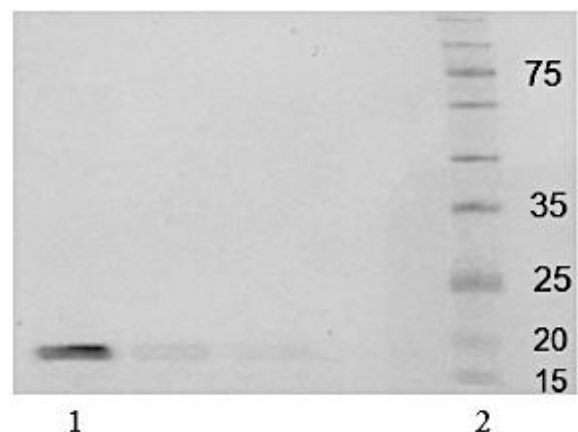
### 3.2. SDS-PAGE

The results of the SDS-PAGE analysis revealed different protein bands in the crude extract, which included the most important allergens of *Aspergillus fumigatus* (Figure2).



**Figure 2.** Results of SDS-PAGE samples of *Aspergillus*, silver staining. The crude extract (1); protein standard (2). Standard molecular weight measurements from top to bottom are 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20, and 15 kDa, respectively.

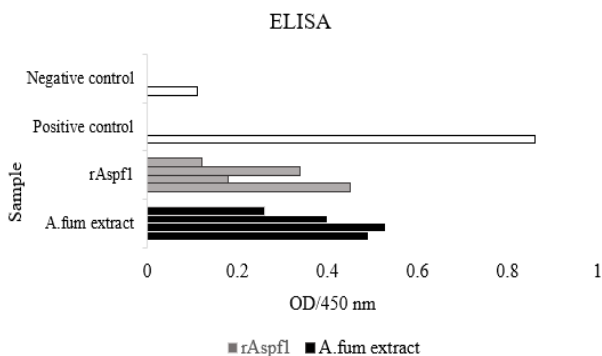
The crude extract proved challenging to standardize due to the presence of nonprotein components or low stability. Consequently, instead of purifying native Asp f 1 from the *Aspergillus* extract, we produced recombinant Asp f 1 (rAsp f 1). rAsp f 1 was produced as a histidine (His6)-tagged fusion protein and purified using a Ni-NTA column. The eluted materials were analyzed using SDS-PAGE under reducing conditions and visualized through Coomassie blue staining (Figure3).



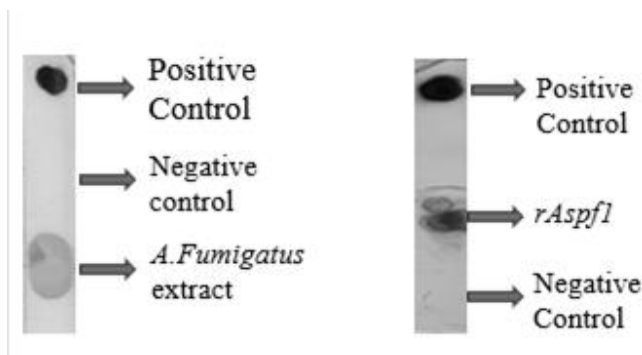
**Figure 3.** The purified recombinant protein (rAsp f 1) showed a single band on SDS-PAGE. The purified recombinant Asp f 1(1), The markers are indicated in kDa (molecular weight).

The ELISA results revealed positive reactivity of IgE antibodies in the serum of *A. fumigatus*-sensitive patients for both natural and recombinant extracts. An optical density (OD) value below 0.11 was considered negative (figure4). The dot blot assay showed that the majority of the patients were sensitized to rAspF1

(71.4%), while 28.6% showed sensitization to other allergens (Figure 5). Hence, rAsp f 1 demonstrated immunoreactivity with the IgE antibody and can be utilized for diagnosing sensitization to *A. fumigatus*.



**Figure 4.** The result of ELISA assay for measuring specific IgE binding to the *Aspergillus fumigatus* extract (black) and rAsp f1 (gray) for each patient.



**Figure 5.** Dot blot analysis: Strips (nitrocellulose membrane) coated with purified rAsp f 1 and *Aspergillus fumigatus* extract, anti-human IgE antibody as positive control, Bovin Serum Albumin (BSA) as negative control.

#### 4. Discussion

Allergies impact many people worldwide, leading to reduced productivity and increased healthcare costs (24–26). Researchers are actively pursuing improved methods for diagnosing, treating, and preventing allergic reactions, including those caused by *A. fumigatus* (27). The lack of standardized extracts for diagnosing *A. fumigatus*-related diseases is a significant challenge, but molecular and biotechnology methods offer potential solutions for producing pure allergens in large quantities (28).

Our study demonstrated the successful production of recombinant Asp f 1 (rAsp f 1) using *E. coli*, which is a commonly used host for recombinant protein production. The results obtained from ELISA and dot blot methods confirmed the protein's biological activity, as it reacted with IgE antibodies in the patient's serum similarly to the natural extract. Therefore, rAsp f 1 can be utilized to diagnose allergies and is suitable for the specific diagnosis of sensitivity to *A. fumigatus*. Garcia *et al.* (2005) also produced the recombinant allergens Asp f 1 and Asp f 1 del (7–22) in *E. coli* BL21 DE3 cells, similar to our study. To compare their allergenic properties, ELISA and immunoblot tests were performed. The results showed that rAsp f 1 del (7–22) had

a significantly decreased reactivity to IgE compared to rAsp f 1 (29). Priyadarsiny *et al.* (2003) cloned and expressed the Asp f1 allergen using a eukaryotic expression system, *Spodoptera frugiperda* insect cells (Sf9). They characterized its immunogenicity by immunoblotting using monoclonal antibodies, and the levels of IgG and IgE in the serum of ABPA patients were determined. Their results demonstrated that the expressed Asp f 1 had post-translational modifications and was biologically active. The protein produced in this study also had biological activity and could react with IgE antibodies in the patient's serum (18). Muthu *et al.* (2020), in order to detect sensitivity to *A. fumigatus* in patients with asthma and ABPA, similar to this study, used r.ASPF allergens, crude allergen extracts of *A. fumigatus*, and allergens from other fungi to evaluate cross-reactions. The results showed that due to cross-reaction with other fungi, recombinant Asp f 1 and Asp f 2 are recommended for diagnosing *A. fumigatus* sensitivity (30).

These previous studies and our current study emphasize the potential of recombinant Asp f 1 as a valuable tool for investigating the immunological properties of *Aspergillus*-related allergies and developing improved diagnostic and therapeutic approaches. This study had a limited number of samples. This was primarily due to the low prevalence of fungal allergies in the general population and the low levels of *A. fumigatus* specific IgE in the serums of patients. So, it is suggested that further research be done in this field, with a focus on obtaining larger and more samples and comparing natural Asp f 1 with recombinant Asp f 1. These will contribute to a more robust and comprehensive understanding of the role of Asp f 1 in allergic reactions and improve the applicability of findings in clinical settings.

In conclusion, In the current study, recombinant Asp f 1 was produced in *E. coli*, and its allergenicity was confirmed by several methods. Further research and clinical studies are warranted to validate the utility of recombinant Asp f 1 in diagnosing and managing *Aspergillus*-related allergies.

#### 5. Acknowledgment

The authors would like to thank all the patients and the staff of the Core Research Laboratory at Birjand University of Medical Sciences in Birjand, Iran.

#### 6. Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### 7. Ethical approval

This study was approved by the Ethics Committee of Birjand University of Medical Sciences (IR.BUMS.REC.1401.073).

#### 8. Funding

This study was conducted with financial support provided by a grant from the Birjand University of Medical Sciences (grant no. 456642).

---

**References:**

1. Narang NS, Casciola-Rosen L, Li S, Chung L, Fiorentino DF. Cutaneous ulceration in dermatomyositis: association with anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibodies and interstitial lung disease. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015 May;67(5):667-72. doi: 10.1002/acr.22498. PMID: 25331610; PMCID: PMC4404195.
2. Tonutti A, Motta F, Ceribelli A, Isailovic N, Selmi C, De Santis M. Anti-MDA5 Antibody Linking COVID-19, Type I Interferon, and Autoimmunity: A Case Report and Systematic Literature Review. *Front Immunol*. 2022 Jun 27;13:937667. doi: 10.3389/fimmu.2022.937667. PMID: 35833112; PMCID: PMC9271786.
3. Le C, Bedocs PM. Calcinosis Cutis. 2022 Jul 12. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 28846311.
4. Lundberg IE, de Visser M, Werth VP. Classification of myositis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018 May;14(5):269-278. doi: 10.1038/nrrheum.2018.41. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29651121.
5. Vencovský J, Alexanderson H, Lundberg IE. Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Rheum Dis Clin North Am*. 2019 Nov;45(4):569-581. doi: 10.1016/j.rdc.2019.07.006. PMID: 31564297.
6. Valenzuela A, Song P, Chung L. Calcinosis in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*. 2018 Nov;30(6):554-561. doi: 10.1097/BOR.000000000000539. PMID: 30124603.
7. Moghadam-Kia S, Oddis CV, Aggarwal R. Anti-MDA5 Antibody Spectrum in Western World. *Curr Rheumatol Rep*. 2018 Oct 31;20(12):78. doi: 10.1007/s11926-018-0798-1. PMID: 30382445.
8. Distler M, Distler J, Ciurea A, Kyburz D, Müller-Ladner U, Reich K, Distler O. Evidenzbasierte Therapie des Raynaud-Syndroms [Evidence-based therapy of Raynaud's syndrome]. *Z Rheumatol*. 2006 Jul;65(4):285-9. German. doi: 10.1007/s00393-006-0068-x. PMID: 16804699.
9. Selva-O'Callaghan A, Romero-Bueno F, Trallero-Araguás E, Gil-Vila A, Ruiz-Rodríguez JC, Sánchez-Pernaute O, Pinal-Fernández I. Pharmacologic Treatment of Anti-MDA5 Rapidly Progressive Interstitial Lung Disease. *Curr Treatm Opt Rheumatol*. 2021;7(4):319-333. doi: 10.1007/s40674-021-00186-x. Epub 2021 Sep 28. PMID: 34603940; PMCID: PMC8476986.
10. Zhang QC, Liu MY, Chen ZX, Chen YT, Lin CS, Xu Q. Case Report: Treatment of Anti-MDA5-Positive Amyopathic Dermatomyositis Accompanied by a Rapidly Progressive Interstitial Lung Diseases With Methylprednisolone Pulse Therapy Combined With Cyclosporine A and Hydroxychloroquine. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Nov 27;7:610554. doi: 10.3389/fmed.2020.610554. PMID: 33330573; PMCID: PMC7732655.



# Ludzki rinowirus RV-16 hamuje syntezę i uwalnianie TSLP w komórkach śródbłonna naczyniowego płuc

## Human rhinovirus RV-16 impairs TSLP synthesis and release in pulmonary vascular endothelial cells

KACPER LESZCZYŃSKI<sup>1</sup>, SYLWIA MOSKWA<sup>1\*</sup>, IZABELA GULBAS<sup>2</sup>, MACIEJ CHAŁUBIŃSKI<sup>2</sup>, DOROTA PASTUSZAK-LEWANDOSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

<sup>2</sup> Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

\* Autor korespondencyjny

### Streszczenie

#### Wstęp

Wpływ RV-16 na śródbłonek naczyniowy płuc nie został jeszcze w pełni poznany. Sugeruje się, że komórki śródbłonna naczyniowego płuc, podobnie jak komórki nabłonkowe, mogą również reagować nadmiernym wytwarzaniem cytokin prozapalnych.

#### Cel

Głównym celem pracy było zbadanie odpowiedzi cytokinowej komórek śródbłonna płuc na zakażenie RV-16 w hodowli *in vitro*, w kontekście modulacji wytwarzania niebadanej do tej pory pod tym kątem cytokiny, jaką jest limfopoetyna zrzębu grasicy (TSLP). Oznaczenia TSLP były również prowadzone w hodowli zakażonej RV-16 po dodaniu IL-33 wraz z jednoczesnym zablokowaniem receptora ST2 tej cytokiny przeciwciałami anty-ST2.

#### Materiał i metody

W badaniu wykorzystano ludzkie komórki śródbłonna mikronaczyj płuc (HMVEC-L), które były zakażane tylko RV-16, lub takie komórki zakażone RV-16 poddane stymulacji IL-33, w środowisku z lub bez przeciwciał blokujących receptor ST2 tej cytokiny. W supernatantach oznaczano TSLP przy użyciu testu immunoenzymatycznego (ELISA).

#### Wyniki

W hodowlach komórkowych zakażonych RV-16, w 72 godzinie inkubacji, wykazano istotnie niższe stężenie TSLP w porównaniu do hodowli bez wirusa. Stymulacja komórek zakażonych RV-16 IL-33 w obecności lub nieobecności przeciwciał anty-ST2 nie miała wpływu na wytwarzanie i wydzielanie TSLP.

#### Wnioski

Zakażenie komórek śródbłonna płuc RV-16 wiąże się z osłabieniem syntezy i wydzielania TSLP. IL-33 nie wpływa w sposób istotny na odpowiedź komórek śródbłonna płuc zakażonych RV-16, w kontekście syntezy i uwalniania TSLP.

Słowa kluczowe: TSLP, rinowirus, IL-33, śródbłonek, płuca, infekcja

### Summary

#### Introduction

The effect of RV-16 on the lung endothelium has not yet been fully defined. It has been suggested that infection of lung endothelial cells with RV-16 drives the production of proinflammatory cytokines.

#### Aim

The study's main objective was to investigate lung endothelial cells' antiviral response *in vitro* to RV-16 infection in the context of modulation the concentration of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), which has not been assessed yet. TSLP has been also determined in cell cultures exposed to the virus and stimulated with IL-33 in the presence of antibodies towards the IL-33 receptor (ST2).

#### Material and methods

Human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) were infected with RV-16 or infected with this virus and stimulated with IL-33 in the presence or absence of anti-ST2 antibodies. In the supernatant TSLP level was determined using an enzyme immunoassay (ELISA).

#### Results

The TSLP level in cell cultures infected with RV-16, at 72 hours of incubation, was significantly lower compared to the cell culture in medium alone. Stimulation of cells infected with RV-16 with IL-33, in the presence or absence of anti-ST2 antibodies, did not influence the TSLP production and secretion.

#### Conclusions

RV-16 infection of lung endothelial cells is associated with decreased TSLP synthesis and release. IL-33 does not significantly affect the response of RV-16-infected lung endothelial cells in the context of TSLP synthesis and release.

Key words: TSLP, rinowirus, IL-33, endothelium, lung, infection

© **Alergia Astma Immunologia** 2024, 29(1) 6-10

www.alergia-astma-immunologia.pl



**Adres do korespondencji / Address for correspondence**

dr n. med. Sylwia Moskwa

Zakład Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź  
e-mail: sylwia.moskwa@umed.lodz.pl

## Wykaz skrótów

**CD** – antygen różnicowania komórkowego (ang. *cluster of differentiation*)

**ELISA** – test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

**HMVEC-L** – ludzkie komórki śródbłonka mikronaczyń płuc (ang. *human microvascular endothelial cells – lungs*)

**ICAM-1** - cząsteczka przylegania międzykomórkowego (ang. *intercellular adhesion molecules*)

**IFN** - interferon (ang. *interferons*)

**IL** - interleukina (ang. *interleukin*)

**IP-10** - białko-10 indukowane IFN-gamma (ang. *interferon gamma-induced protein 10*)

**MOI** - wielokrotność zakażenia (ang. *multiplicity of infection*)

**NK** – naturalne komórki zabijające (ang. *natural killer*)

**POChP** – przewlekła obturacyjna choroba płuc

**RANTES** - cytokina RANTES (ang. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*)

**RV-16** – rinowirus 16 (ang. *rhinovirus 16*)

**ST2** – receptor 1 dla interleukiny 1 (ang. *Interleukin 1 receptor-like 1*)

**TSLP** – limfopoetyna zrębu grasicy (ang. *thymic stromal lymphopoietin*)

## 1. Wstęp

Rinowirus (RV) to najczęstszy czynnik etiologiczny ostrego zapalenia nosogardzieli (popularnie przeziębienie). Ponadto zakażenie tym wirusem zaostrza przebieg przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP), wpływa na rozwój astmy oskrzelowej, a także może powodować ciężkie zapalenie oskrzelików u niemowląt i dzieci lub zapalenie płuc u dorosłych i osób starszych [1].

Ludzki rinowirus należy do rodziny *Picornaviridae* i rodzaju *Enterovirus*, posiada jednoniciowy RNA o dodatniej polarności. Wirus klasyfikuje się filogenetycznie do 3 grup tj. A, B lub C, a w tym do około 160 serotypów, które różnią się między sobą białkami powierzchniowymi. Użyty w tym badaniu RV-16 należy do grupy A i aby wnikać do infekowanej komórki wykorzystuje jako receptor międzykomórkową adhezynę 1 (ang. *intracellular adhesion molecule 1, ICAM-1*; ang. *cluster of differentiation 54, CD54*).

Pierwszą linię obrony w infekcji rinowirusem stanowią komórki docelowe dla wirusa, jakimi są komórki nabłonka dróg oddechowych. Wykazano, że zakażone RV mogą być również komórki śródbłonka, które uczestniczą w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej gospodarza [2]. Komórki te wyścielają naczynia krwionośne i limfatyczne tworząc barierę pomiędzy krążącą krwią lub limfą a głębszymi warstwami ściany naczynia. Powierzchniowe umiejscowienie komórek śródbłonka sprawia, że pełnią one wiele istotnych funkcji w utrzymaniu homeostazy środowiska. Infekcja wirusem indukuje wytwarzanie przez komórki ulegające zakażeniu różnych cytokin, w tym chemokin czy interferonów typu I: interferonu (ang. *interferon, IFN*) IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  [3].

Limfopoetyna zrębu grasicy (ang. *thymic stromal lymphopoietin, TSLP*) to cytokina prozapalna oddziałująca na szereg komórek odpornościowych, w tym (limfocyty T pomocnicze (ang. *T helper, Th*), komórki tuczne czy naturalne komórki zabijające (ang. *natural killer, NK*), a także komórki dendrytyczne, stymulując ich dojrzewanie [4,5]. TSLP reguluje reakcję limfocytów T, w odpowiedzi na antygeny, wpływając na ich różnicowanie w kierunku subpopulacji limfocytów pomocniczych Th2, a także na proliferację i różnicowanie limfocytów B. Jej największy wpływ wykazano w przebiegu astmy oskrzelowej, gdzie zaangażowana jest w inicjowanie i utrzymywanie się stanu zapalnego [6].

Biorąc pod uwagę efekty oddziaływania TSLP na komórki odpornościowe i niewiele informacji na temat odpowiedzi cytokinowej komórek śródbłonka na zakażenie RV-16, w prezentowanych obecnie badaniach użyto hodowlę ludzkich komórek śródbłonka mikronaczyń płuc do zbadania *in vitro* syntezy i uwalniania TSLP pod wpływem zakażenia RV-16.

## 2. Materiał i metody

### 2.1. Komórki

Komercyjnie dostępne ludzkie komórki śródbłonka mikronaczyń płuc (ang. *Human Lung Microvascular Endothelial Cells, HMVEC-L*) (CC-2527, Lonza, Walkersville, MD, USA), hodowano w specjalistycznym podłożu dla komórek śródbłonkowych (ang. *endothelial growth medium, EGM-2*) (CC-3156, Lonza, Walkersville, MD, USA), z dodatkiem suplementu dedykowanego tym komórkom (ang. *Endothelial Growth Medium-2 MV, EGM-2MV*; SingleQuotes) (CC-4147, Lonza, Walkersville, MD, USA). Butelki hodowlane umieszczano w inkubatorze CO<sub>2</sub> (temp. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po uzyskaniu 80-90% konfluencji, komórki poddawano trypsynizacji z użyciem 0,25% roztworem trypsyny w 0,02 roztworze kwasu etylenodiaminotetraoctowego – EDTA (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) (59417C, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), a następnie enzym neutralizowano za pomocą roztworu neutralizującego trypsynę (ang. *trypsin neutralizing solution*) (CC-5002, Lonza, Walkersville, MD, USA). Przed użyciem komórek do dalszych badań, komórki przepłukiwano roztworem buforowanej fosforanem soli fizjologicznej – PBS (ang. *phosphate-buffered saline*) i doprowadzano do gęstości 4 x 10<sup>5</sup> komórek/mL w podłożu do hodowli.

### 2.2. Infekcja RV-16

Rinowirus o serotypie 16 uzyskany został od Profesora Sebastiana Jonhnston'a z Department of Respiratory and Airways Disease Medicine, Imperial College w Londynie, w Wielkiej Brytanii. Hodowla komórek HMVEC-L zakażana była RV-16 w proporcji 1:3 (ang. *multiplicity of infection; MOI*) – MOI 3.0 i umieszczana w inkubatorze CO<sub>2</sub> na 3 godziny (temp. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po inkubacji, nadsącz usuwano, a komórki przemywano 3-krotnie za pomocą buforowanego roztworu soli HEPES (CC-5022, Lonza, Walkersville, MD, USA), po czym dodawano świeże podłoże hodowlane i dalej prowadzono hodowlę komórkową. Kontrolę negatywną stanowiły niezakażone komórki w podłożu hodowlanym (Sp – hodowla do oceny spontanicznej zdolności wzrostu i aktywności sekrecyjnej komórek).

### 2.3. Stymulacja IL-33 i blokada receptora ST2

W celu zbadania wpływu IL-33 na indukowaną przez RV-16 syntezę i uwalnianie TSLP, HMVEC-L inkubowano wstępnie z IL-33 (10 ng/ml) przez 24 godziny, a następnie do hodowli dodawano RV-16 (MOI 3,0). Aby zablokować powierzchniowy receptor komórkowy ST2 dla IL-33, komórki były pre-inkubowane z przeciwciałami anti-ST2 (AF523, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) w stężeniu 3 µg/mL przez 3h. Przeciwciała te obecne były w podłożu hodowlanym przez cały czas trwania hodowli. W następnym kroku komórki inkubowane były z RV-16 o MOI 3,0, a po 24h dodawana była IL-33 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) w stężeniu 10 ng/mL.

### 2.4. Badanie syntezy i wydzielania TSLP

Do oznaczenia stężenia TSLP w supernatantach z hodowli komórkowych zastosowano handlowy test immunoenzymatyczny (Cloud-Clone Corp., USA) o czułości w zakresie 7,8-500 pg/mL.

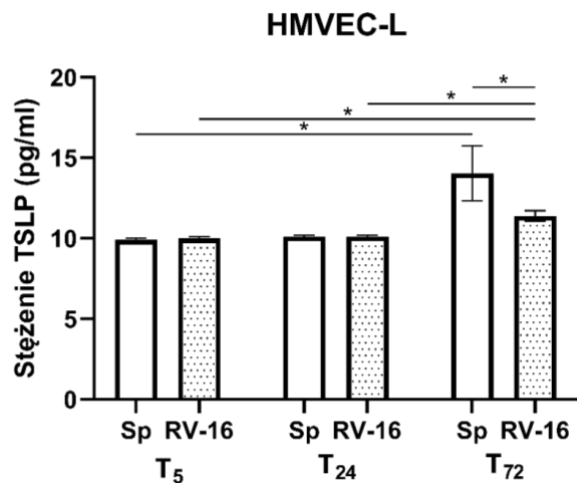
### 2.5. Analiza statystyczna

Rozkład zmiennych został sprawdzony za pomocą testu W Shapiro-Wilka. Do porównania stężenia TSLP w zależności od czasu inkubacji, w badanej hodowli, zastosowano test T Studenta, przyjmując poziom istotności różnic  $p < 0,05$ . W celu sprawdzenia różnic pomiędzy badanymi grupami, w zależności od czasu hodowli, zastosowano test Levene'a jednorodności wariancji.

## 3. Wyniki

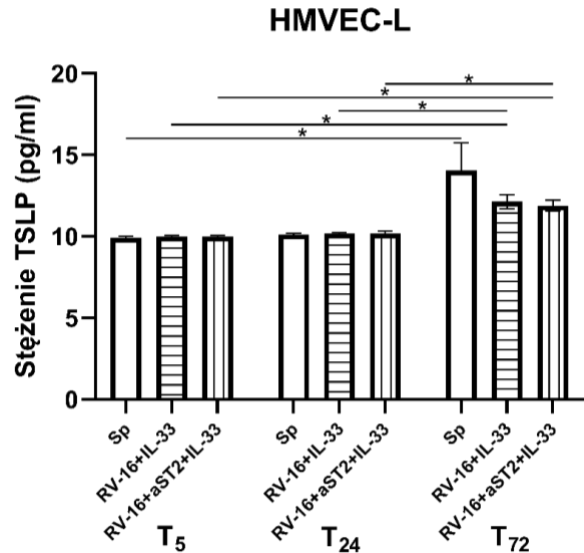
Stężenie TSLP oznaczano w każdej hodowli w 3 punktach czasowych, po upływie 5, 24 i 72 godzin:  $T_5$ ,  $T_{24}$  i  $T_{72}$ .

W przypadku hodowli HMVEC-L niezakażonej RV-16, istotny wzrost syntezy i uwalniania TSLP ( $p < 0,05$ ) uzyskano w punkcie czasowym  $T_{72}$ , w porównaniu do  $T_5$  (Ryc. 1). W  $T_{72}$  zakażenia RV-16 wykazano istotnie wyższe stężenie TSLP ( $p < 0,05$ ), w porównaniu do oznaczeń w punktach czasowych  $T_5$  i  $T_{24}$ . Jednakże stężenie TSLP ( $p < 0,05$ ) w  $T_{72}$  hodowli zakażonej rinowirusem było istotnie niższe ( $p < 0,05$ ), w porównaniu do stężenia tej cytokiny w hodowli niezakażonej.



**Rycina 1.** Kinetyka wytwarzania limfopoetyny zrębu grasicy (TSLP) przez komórki śródbłonna naczyniowego płuc (HMVEC-L), niezakażone lub zakażone wirusem RV-16, w hodowlach *in vitro*. Sp – hodowla komórek w samym podłożu (spontaniczne wydzielanie TSLP),  $T_5$ ,  $T_{24}$ ,  $T_{72}$  – punkty pomiaru po 5, 24 i 72 godzinach hodowli. Istotność statystyczna \* -  $p < 0,05$ .

Ponadto wykazano istotny wzrost stężenia TSLP ( $p < 0,05$ ) po 72 godzinach ( $T_{72}$ ) hodowli komórek zakażonych RV-16 i stymulowanych IL-33, w porównaniu do takiej hodowli po 24 godzinach ( $T_{24}$ ) lub po 5 godzinach ( $T_5$ ) (Ryc. 2). Komórki zakażone wirusem, traktowane uprzednio przeciwciałami anti-ST2 i stymulowane IL-33 również uwolniły więcej TSLP w punkcie czasowym  $T_{72}$ , w porównaniu do komórek w takim wariancie hodowli, w punktach czasowych  $T_{24}$ , lub  $T_5$ .



**Rycina 2.** Kinetyka wytwarzania limfopoetyny zrębu grasicy (TSLP) przez komórki śródbłonna naczyniowego płuc (HMVEC-L), niezakażone lub zakażone wirusem RV-16, w środowisku z lub bez interleukiny (IL-33) i przeciwciał przeciwko receptorowi ST2 tej cytokiny, w hodowlach *in vitro*. Sp – hodowla komórek w samym podłożu (spontaniczne wydzielanie TSLP); RV-16+IL-33 - hodowla komórek zakażona wirusem RV-16 i traktowana IL-33, RV-16+IL-33+aST2 – hodowla komórek zakażona wirusem RV-16, traktowana IL-33 i przeciwciałami przeciwko receptorowi ST2 tej cytokiny.  $T_5$ ,  $T_{24}$ ,  $T_{72}$  – punkty pomiaru po 5, 24 i 72 godzinach hodowli. Istotność statystyczna: \* -  $p < 0,05$

Nie wykazano istotnych różnic w stężeniu TSLP pomiędzy hodowlami komórek zakażonymi RV-16, zakażonymi RV-16 i stymulowanymi IL-33 lub pre-inkubowanymi z przeciwciałami anti-ST2, a następnie zakażonymi RV-16 i stymulowanymi IL-33, we wszystkich trzech punktach czasowych.

## 4. Dyskusja

W przeprowadzonym badaniu *in vitro* wykazano, że komórki śródbłonna mikronaczyń płuc niezależnie od zakażenia rinowirusem stale syntetyzują i uwalniają limfopoetynę zrębu grasicy. W hodowli komórek w samym podłożu, w każdym kolejnym punkcie czasowym stężenie TSLP było wyższe. Wyniki te są spójne z wynikami badań Emi-Sugie i wsp., w których, w niestymulowanej hodowli HMVEC-L po upływie 48h wykazano stężenie TSLP w zakresie 0-50 pg/mL [7].

Również w hodowli zakażonej RV-16 synteza i uwalnianie TSLP wzrastało wraz z czasem hodowli, osiągając najwyższe stężenie w punkcie czasowym  $T_{72}$ . Jednak, w porównaniu do hodowli komórek w samym podłożu, w hodowli zakażonej rinowirusem stężenie TSLP w ostatnim badanym punkcie czasowym, w 72 godzinie hodowli, było istotnie niższe i nie przekraczało 13 pg/mL. Świadczyć to może o negatywnej regulacji wytwarzania TSLP podczas zakażenia wirusem

RV-16. W badaniu przeprowadzonym u hospitalizowanych niemowląt z wirusowym zapaleniem oskrzelików wykazano podobną tendencję [8].

Również Guo-Parke i wsp. w badaniu na hodowlach dobrze zróżnicowanych pierwotnych komórek nabłonka oskrzeli (ang. well-differentiated primary bronchial epithelial cells, WD-PBEC), izolowanych od pacjentów z POChP zakażonych rinowirusem, wykazali istotnie niższe stężenie TSLP, w porównaniu do osób zdrowych, ( $p < 0,05$ ) [9]. Badacze ci wykazali wyższe początkowe stężenia cytokin, takich jak: interferon gamma (ang. interferon gamma, IFN- $\gamma$ ), IFN- $\beta$ , białko-10 indukowane IFN- $\gamma$  (IP-10) i IL-10, w hodowlach komórek od chorych na POChP, co prawdopodobnie prowadzi u takich pacjentów do dominacji profilu zapalnego odpowiedzi immunologicznej z udziałem limfocytów pomocniczych Th1. Jednocześnie obniżony poziom IL-13 u ww. pacjentów prowadzi do ograniczenia odpowiedzi Th2, z czym prawdopodobnie wiąże się – obniżenie stężenia TSLP [9]. Jednakże w hodowlach komórek nabłonka oskrzeli zakażonych syncytialnym wirusem oddechowym (RSV), izolowanych od dzieci chorych na astmę oskrzelową, stężenie TSLP było wyższe w porównaniu do stężenia tej cytokiny w hodowlach komórek nabłonka oskrzeli dzieci zdrowych [10]. Lee i wsp. dodatkowo wykazali na myszach z niedoborem receptora TSLPR, zakażonych RSV, że TSLP indukowane przez RSV bierze udział w promowaniu odpowiedzi Th2 [10]. Jakkolwiek należy zaznaczyć, iż porównanie odpowiedzi immunologicznej lub zapalnej indukowanej przez różne wirusy układu oddechowego budzi zastrzeżenia, ponieważ różne szczepy rinowirusów mogą indukować inne cytokiny i chemokiny.

W obecnie prezentowanej pracy stymulacja IL-33 zakażonych RV-16 komórek śródbronka naczyńowego płuc skutkowała pobudzeniem syntezy i wydzielania TSLP do środowiska hodowlanego wraz z wydłużeniem czasu hodowli. Podobny efekt wykazano również po zablokowaniu receptora ST2 IL-33 przez przeciwciała anti-ST2 co wskazuje, że efekt wzrostu wytwarzania TSLP nie był zależny od obecności w hodowli egzogennej IL-33. Podwyższony poziom TSLP wykazany w hodowlach komórek zakażonych wirusem i stymulowanych IL-33, w 72 godzinie hodowli, nie był jednak istotnie statystycznie różny w porównaniu do poziomu TSLP w hodowlach zakażonych RV-16, które nie były stymulowane IL-33. W pracy Gajewskiego i wsp. wykazano wpływ IL-33 na syntezę cytokin prozapalnych, innych niż TSLP, w hodowli HMVEC-L zakażonej RV-16 i pre-stymulowanej IL-33. W badaniu tym wykazano wyższe stężenie cytokin takich jak: IL-1 $\beta$ , IL-6, RANTES (ang. regulated on activation, normal t cell expressed and secreted), czy IP-10, w zakażonych RV-16 hodowlach komórek śródbronka stymulowanych IL-33, w porównaniu do hodowli komórkowych niestymulowanych tą cytokiną [2].

Uzyskane wyniki stanowią przesłankę do dalszych badań w celu potwierdzenia roli wirusów oddechowych w hamowaniu wytwarzania TSLP przez inne wirusy oddechowe, znaczenia równowagi odpowiedzi Th1/Th2 lub jej zaburzenia, dla syntezy TSLP w różnych chorobach dróg oddechowych i wyjaśnienia znaczenia tych procesów w patogenezie infekcji wirusowych.

## 5. Wnioski

Podsumowując, w badaniach prezentowanych w niniejszej pracy wykazaliśmy, że komórki śródbronka naczyńowego płuc podczas wzrostu w warunkach hodowli *in vitro* syntetyzują i uwalniają limfopoetynę zębą grasicy. Jednakże, zakażenie takich komórek RV-16 skutkuje osłabieniem syntezy i wydzielania przez nie TSLP. Stymulacja IL-33 nie wpłynęła w istotny sposób na wytwarzanie TSLP przez zakażone RV-16 komórki śródbronka płuc.

**Bibliografia:**

1. Jacobs SE, Lamson DM, Kirsten S, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1). doi:10.1128/CMR.00077-12
2. Gajewski A, Gawrysiak M, Szewczyk R, et al. IL-33 augments the effect of rhinovirus HRV16 on inflammatory activity of human lung vascular endothelium—possible implications for rhinoviral asthma exacerbations. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2021;76(7). doi:10.1111/all.14806
3. Fosse JH, Haraldsen G, Falk K, Edelmann R. Endothelial Cells in Emerging Viral Infections. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8. doi:10.3389/fcvm.2021.619690
4. Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2012;130(4). doi:10.1016/j.jaci.2012.07.010
5. Kashyap M, Rochman Y, Spolski R, Samsel L, Leonard WJ. Thymic Stromal Lymphopoietin Is Produced by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology.* 2011;187(3). doi:10.4049/jimmunol.1100355
6. Parnes JR, Molfino NA, Colice G, Martin U, Corren J, Menzies-Gow A. Targeting TSLP in Asthma. *J Asthma Allergy.* 2022;15. doi:10.2147/JAA.S275039
7. Emi-Sugie M, Shoda T, Futamura K, et al. Robust production of IL-33 and TSLP by lung endothelial cells in response to low-dose dsRNA stimulation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020;146(6). doi:10.1016/j.jaci.2020.03.042
8. García-García ML, Calvo C, Moreira A, et al. Thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and periostin in hospitalized infants with viral bronchiolitis. *Medicine (United States).* 2017;96(18). doi:10.1097/MD.0000000000006787
9. Guo-Parke H, Linden D, Mousnier A, et al. Altered Differentiation and Inflammation Profiles Contribute to Enhanced Innate Responses in Severe COPD Epithelium to Rhinovirus Infection. *Front Med (Lausanne).* 2022;9. doi:10.3389/fmed.2022.741989
10. Lee HC, Headley MB, Loo YM, et al. Thymic stromal lymphopoietin is induced by respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells and promotes a type 2 response to infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2012;130(5). doi:10.1016/j.jaci.2012.07.031

# Generowanie odpowiedzi zapalnej i przeciwwirusowej przez komórki śródbłonka naczyń płucnych w odpowiedzi na stymulację receptora TLR3

## Generation of inflammatory and antiviral response by human lung endothelial cells in response to TLR3 stimulation

WOJCIECH KARPIK<sup>1,2</sup>, IZABELA GULBAS<sup>2</sup>, MAGDALENA CHMIELA<sup>1</sup>, MACIEJ CHAŁUBIŃSKI<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biologii i Immunologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

<sup>2</sup> Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

\* Autor korespondencyjny

### Streszczenie

#### Wstęp

Według najnowszych badań komórki śródbłonka mikronaczyniowego płuc posiadają receptory, które wiążą wirusy oddechowe i mogą być przez nie infekowane. Komórki śródbłonka wykazują także ekspresję rozmaitych receptorów PRR, odpowiadających za generowanie nieswoistej odpornościowej. Cytokiny produkowane przez śródbłonek oprócz ochronnych właściwości w przypadku infekcji, mogą także brać udział w rozwoju stanów patologicznych, nasilając objawy chorób przewlekłych takich jak astma. Niewiele jest doniesień o potencjale śródbłonka do produkcji cytokin prozapalnych i przeciwwirusowych, oraz udziale receptorów PRR w tych procesach.

#### Cel

Celem pracy było zbadanie generowania odpowiedzi zapalnej i przeciwwirusowej komórek śródbłonka w warunkach *in vitro*, po stymulacji agonistą receptora TLR3 – poli(I:C).

#### Materiał i metody

Zbadano poziom ekspresji mRNA cytokin prozapalnych – IL-6, IL-8, RANTES, a także białek przeciwwirusowych – IFN- $\beta$ , OAS-1, PKR. Do oceny ekspresji mRNA użyto metody Real time PCR.

#### Wyniki

Nasze badania sugerują, że receptor TLR3 jest kluczowy w indukowaniu mechanizmów odpornościowych generowanych przez śródbłonek. Receptor ten posiada bardzo wysoki potencjał do zwiększania ekspresji mRNA cytokin prozapalnych i przeciwwirusowych. Poli(I:C) w warunkach *in vitro* skutecznie stymulował komórki HMVEC-L naśladując infekcję komórek przez wirusy. Poli(I:C) był zarazem najskuteczniejszym z zastosowanych stymulatorów, doprowadzając do wzmożonej ekspresji mRNA wszystkich badanych genów.

#### Wnioski

Z danych literaturowych i przeprowadzonych badań wynika także, iż komórki śródbłonka są dobrze przystosowane do rozpoznawania RNA wirusów, a w rezultacie do generowania odpowiedzi zapalnej i przeciwwirusowej w warunkach *in vitro*.

Słowa kluczowe: śródbłonek naczyniowy, TLR, agonści, zapalenie, odpowiedź przeciwwirusowa, płuca, poli(I:C)

### Summary

#### Introduction

According to the newest research human lung microvascular endothelial cells express receptors that respiratory viruses can bind to in order to infect said cells. Furthermore, endothelial cells express PRR receptors, responsible for generation of non specific immune response. Cytokines produced by endothelium besides their immunoprotective capabilities, can also take part in pathologies exacerbating symptoms of chronic diseases such as asthma. There are few scientific reports regarding the potential of endothelial cells to produce inflammatory and antiviral cytokines, as well as PRRs' role in these processes.

#### Aim

The aim of the study was to evaluate the generation of inflammatory and antiviral responses of endothelial cells *in vitro*, after stimulation with TLR agonist – poly(I:C).

#### Material and methods

Level of mRNA expression was studied for proinflammatory cytokines – IL-6, IL-8, RANTES, as well as for antiviral proteins – IFN- $\beta$ , OAS1, PKR. The expression of mRNA was evaluated using Real time PCR.

#### Results

Our studies suggest that TLR3 receptor is the key receptor involved in immune mechanisms generated by endothelium. This receptor shows great capability to induce expression of mRNA coding proinflammatory and antiviral proteins. Poly(I:C) *in vitro* stimulated HMVEC L cells with great effect, mimicking viral infection. Moreover poly(I:C) stimulation led to an increased expression of mRNA for all tested genes.

#### Conclusions

Literature data and our research shows, that endothelial cells are well adapted to recognition of viral RNA, resulting in generation of inflammatory and antiviral response.

Key words: vascular endothelium, TLR, agonists, inflammation, antiviral immune response, lungs, poly(I:C)

© *Alergia Astma Immunologia* 2024, 29(1) 11-17

www.alergia-astma-immunologia.pl



Adres do korespondencji / Address for correspondence

dr hab. n. med. Maciej Chałubiński, prof. UM

Zakład Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź  
e-mail: maciej.chalubinski@umed.lodz.pl

## Wykaz skrótów

- AP-1** – białko aktywatorowe-1 (ang. activatory protein)
- DAMPs** – wzorce molekularne związane z uszkodzeniami (ang. damage-associated molecular patterns)
- EDTA** – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
- HMVEC-L** – komórki śródbłonka mikronaczyniowego płuc (ang. human lung microvascular endothelial cells)
- HRV** – ludzkie rinowirusy (ang. human rhinovirus)
- ICAM-1** – cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1 (ang. intercellular adhesion molecule)
- IRF** – czynnik regulujący interferony (ang. interferon regulatory factors)
- NF-κB** – jądrowy czynnik transkrypcyjny κB (ang. nuclear factor κB)
- OAS-1** – syntetaza (ligaza) 2'-5'-oligoadenylanowa-1 (ang. 2'-5'-oligoadenylate synthetase)
- PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
- PKR** – kinaza proteinowa R (ang. protein kinase R), (inaczej – EIF2AK2)
- Poli(I:C)** – kwas poliryboinozynowo- polirybocytydylowy (ang. poly(I:C) – polyinosinic:polycytidylic acid)
- PRRs** – receptory rozpoznające wzorce molekularne (ang. pattern recognition receptors)
- PAMPs** – wzorce molekularne związane z patogenami (ang. pathogen-associated molecular patterns)
- RANTES** – chemokina CCL5 (ang. CCL5 chemokine)
- dsRNA** – dwuniciowy kwas rybonukleinowy (ang. double-stranded ribonucleic acid)
- RT** – odwrotna transkrypcja (ang. reverse transcription)
- TLR** – receptory Toll-podobne (ang. Toll-like receptors)
- TNF-α** – czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor)
- TNS** – czynnik neutralizujący trypsynę (ang. trypsin neutralizing solution)

## Wstęp

Śródbłonek naczyniowy jest to półprzepuszczalna bariera utworzona z jednej warstwy płaskich, wrzecionowatych komórek wyściełających wnętrze naczyń krwionośnych i limfatycznych, która reguluje przenikanie płynów, cząsteczek i komórek układu odpornościowego. Zależnie od miejsca występowania, fenotyp i fizjologia śródbłonka naczyniowego mogą się znacznie różnić [1]. Jest również źródłem wielu cytokin i czynników wzrostowych, interferonów i interleukin prozapalnych. [2–6].

Śródbłonek naczyniowy człowieka posiada receptory wykorzystywane przez wirusy oddechowe, m.in. ludzkie rinowirusy (HRV, *human rhinovirus*) i koronawirusy, i może być przez nie infekowany [3,5–9]. Jednym z receptorów wykorzystywanych do infekcji przez HRV jest receptor ICAM-1 (cząsteczka adhezji międzykomórkowej, *intercellular adhesion molecule-1*), którego dużą ekspresję wykazano na komórkach śródbłonka naczyń płucnych [10]. Śródbłonek naczyniowy wykazuje

ekspresję wielu receptorów czynników zakaźnych, tzw. receptorów rozpoznających wzorce molekularne (PRRs, *pattern recognition receptors*) stanowiących ważny element odporności nieswoistej – w tym receptorów toll-podobnych – (TLRs, *Toll-like receptors*) [10,11]. Receptory TLR aktywowane być mogą przez różnorodne cząsteczki, zarówno komponenty patogenów (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) jak i własne komponenty komórkowe uwalniane podczas uszkodzenia komórek (DAMPs, *damage associated molecular patterns*) [12].

Receptory TLR to przez błonowe glikoproteiny występujące wewnątrzkomórkowo lub zewnątrzkomórkowo i rozpoznające szeroki wachlarz wzorców molekularnych [12,13]. U człowieka wykryto TLR 1-10 [12]. Wykazano, że pewne receptory TLR uznawane za wewnątrzkomórkowe, w tym TLR3, mogą występować także na powierzchni niektórych komórek [14–17]. TLR3 występuje zazwyczaj wewnątrz komórek w formie nieaktywnej w cytozolu, a po aktywacji – w endosomach [13]. Śródbłonek mikronaczyniowy płuc wykazuje wysoką ekspresję TLR3 [18], szczególnie na komórkach aktywowanych [4].

Do ligandów TLR3 należą: kwas poliinozynowo-policytydylowy– (poly(I:C), *polyinosinic:polycytidylic acid*), dwuniciowy RNA wirusów (dsRNA, *double-stranded ribonucleic acid*), a także mRNA martwych komórek [19,20]. Receptor ten uczestniczy w rozpoznawaniu dsRNA wirusa *herpes simplex*, wirusa polio, ludzkich rinowirusów, jak również SARS-CoV-2 [21–23]. TLR3 silnie wiąże dsRNA dłuższe niż 45 nukleotydów i nie rozpoznaje specyficznej sekwencji. Wygenerowany przez TLR3 sygnał doprowadza do aktywacji czynników transkrypcji – IRF3 (czynnik regulujący interferony, *interferon regulatory factor*), IRF7, AP1 (białko aktywatorowe 1, *activatory protein-1*) i czynnika jądrowego - κB (NF- κB, nuclear factor- κB) [15,23]. Poli(I:C) stanowi syntetyczny analog dsRNA i wykazano, że bardzo silnie aktywuje zarówno limfocyty, jak i komórki nabłonka oddechowego oraz śródbłonek naczyniowego [20,24,25]. W odpowiedzi na stymulację TLR3 wytwarzane są m.in. interferony typu I – przeciwwirusowe IFN-α i IFN-β oraz cytokiny prozapalne – IL-6, IL-8, RANTES (chemokina CCL5, *CCL5 chemokine*) i czynnik martwicy nowotworów (TNF-α, *tumor necrosis factor*). Produkcja interferonów przeciwwirusowych prowadzi do nasilenia ekspresji przeciwwirusowych białek, w tym syntetazy oligoadenylanowej 1 – (OAS-1, *2'-5'-oligoadenylate synthetase-1*) i kinazy białkowej R – (PKR, *protein kinase R*), a w konsekwencji do zahamowania mechanizmów replikacji.

Celem pracy była ocena generowania odpowiedzi zapalnej i przeciwwirusowej przez komórki śródbłonka naczyń płucnych człowieka w odpowiedzi na stymulację TLR3.

## Materiał i metody

### Hodowla pierwotnych komórek mikrowaskularnych śródbłonka naczyń płucnych człowieka HMVEC-L

Pierwotne komórki śródbłonka mikronaczyniowego płuc (HMVEC-L, CC 2527, Lonza, Walkersville, Maryland, Stany Zjednoczone) hodowano w podłożu (EMB-2MV, C 22121, PromoCell, Heidelberg, Niemcy) z dodatkiem suplementu (EGM-2MV, C 39221, PromoCell, Heidelberg, Niemcy) oraz antybiotyków penicyliny i streptomycyny (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) w stężeniach odpowiednio

10 000 jednostek i 10 mg/mL. Komórki inkubowane były do czasu osiągnięcia konfluencji w zakresie od 90 do 100%, a następnie trypsynizowane roztworem 0,25% trypsyny w 0,02% roztworze EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy, Sigma Aldrich, 59428C, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) przez 5 minut w temperaturze 37°C. Po inkubacji trypsynę neutralizowano używając czynnika neutralizującego trypsynę (TNS, CC-5002, Lonza, Walkersville, MD, USA). Zawiesinę komórek nanoszono do studzienek 24 dołkowej polistyrenowej płytki hodowlanej ( $2 \times 10^5$  kom./studzienkę) i inkubowano przez noc (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### Stymulacja komórek HMVEC-L z użyciem poli(I:C) i izolacja mRNA

Po 24 godzinach od wysiania komórek na płytkę hodowlaną usunięto medium hodowlane z 24 dołkowej płytki zawierającej komórki HMVEC-L. Do próby kontrolnej (komórek niestymulowanych) dodano 500 µL podłoża hodowlanego, a do pozostałych dołków dodano po 500 µL poli(I:C) o długości 1,5-8 kpz (InvivoGen, San Diego, USA) w stężeniu 10 µg/mL, rozcieńczonego w podłożu hodowlanym. Płytkę inkubowano 24h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) bez wymiany podłoża. Zabezpieczono lizaty komórkowe po 24, 29, 48, 72 i 96 godzinach stymulacji (punkty czasowe wynikają z 24h godzin stymulacji komórek HMVEC-L syntetycznym poli(I:C), a następnie zbiórki materiału w kolejnych punktach czasowych - 5, 24, 48 i 72h). Lizaty komórkowe zebrano przy użyciu buforu lizującego z zestawu ReliaPrem™ zgodnie z procedurą producenta. Z lizatów komórkowych wyizolowano mRNA zgodnie z instrukcją dla zestawu ReliaPrem™ RNA Cell Miniprep System (Promega, Z6012, Madison, Wisconsin, Stany Zjednoczone).

### Odwrotna transkrypcja (RT-PCR) i ocena ekspresji genów za pomocą Real time PCR

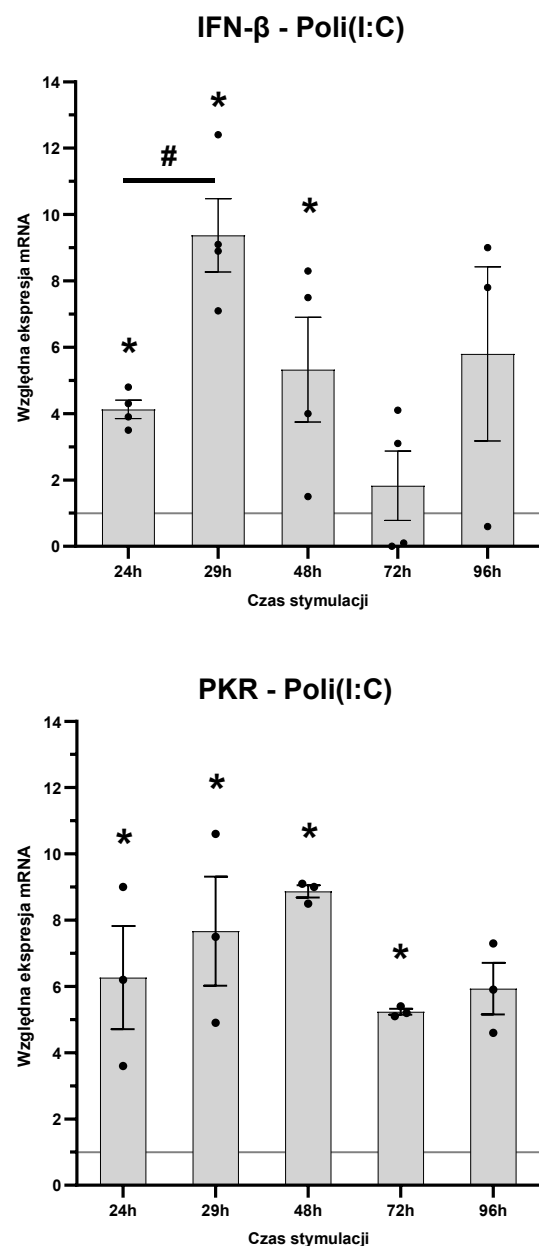
Reakcję odwrotnej transkrypcji (RT-PCR, *reverse transcription PCR*) przeprowadzono z użyciem zestawu opartego o losowe startery *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, 4368813, Wilno, Litwa). Do oceny ekspresji mRNA badanych genów użyto metody PCR w czasie rzeczywistym. Wykorzystano uniwersalną mieszaninę reakcyjną do reakcji PCR (Bufor TaqMan® Universal PCR Master Mix Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, 4304437, Warrington, Wielka Brytania), oraz sondy molekularne dla mRNA kodującego IL-6, IL-8, RANTES, IFN-β, OAS-1, i PKR (Thermo Fisher Scientific). Jako genu referencyjnego użyto dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego – GAPDH.

### Analiza statystyczna uzyskanych wyników

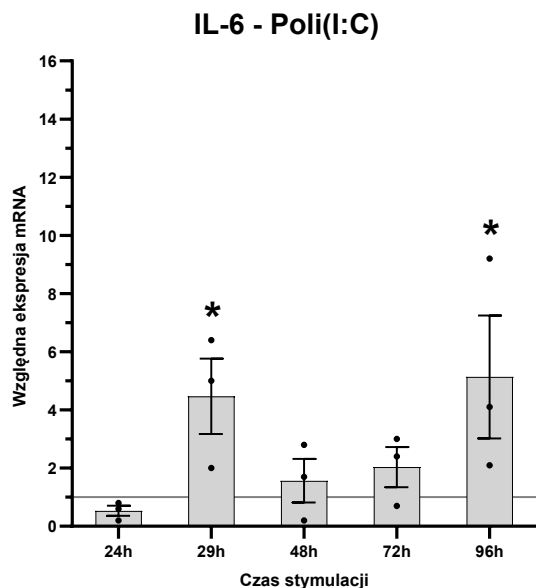
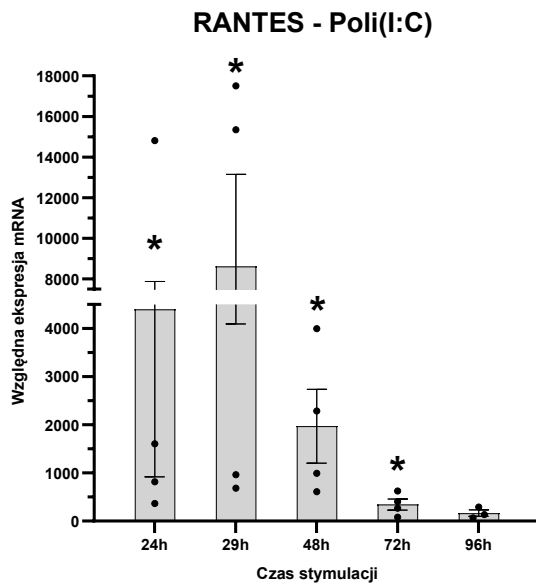
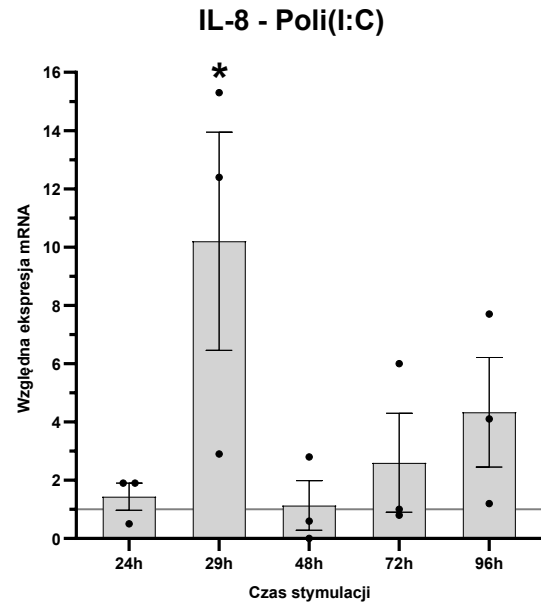
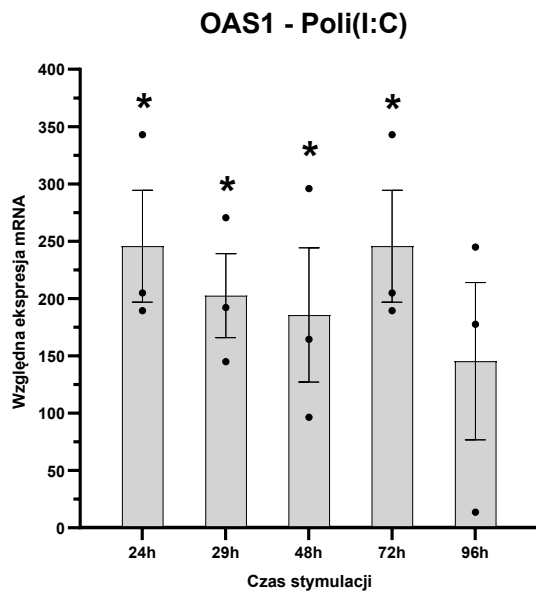
Wyniki zostały zanalizowane statystycznie z zastosowaniem oprogramowania GraphPad Prism 10. Istotność statystyczną wyznaczono w nieparametrycznym teście U Mann-Whitney, który pozwala na porównanie ze sobą dwóch niezależnych wobec siebie grup, bez równoliczności grup i rozkładu normalnego. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej arytmetycznej ± błąd odchylenia standardowe (SD, *Standard deviation*). Istotnie statystycznie przyjęto różnice przy współczynniku prawdopodobieństwa mniejszym niż 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

### Wyniki

W przypadku stymulacji komórek śródbłonna poli(I:C) wykazano wzrost ekspresji mRNA dla cytokin prozapalnych w większości badanych punktów czasowych (Rycina 1). Dla wszystkich cytokin prozapalnych poziom ekspresji mRNA był szczególnie wysoki w 29 godzinie stymulacji. Profil ekspresji mRNA IL-6 i IL-8 w czasie był podobny. Wyższy poziom ekspresji mRNA dla IL-6 zaobserwowano w czasie T29 h i T96 h. W 48 godzinie ekspresja mRNA IL-6 znacznie spadła, a następnie ponownie zaczęła wzrastać. IL-8 najwyższy poziom ekspresji mRNA osiągnęła w 29 godzinie stymulacji. W 48 godzinie ekspresja mRNA IL-8 spadła do poziomu kontroli, a następnie ponownie zaczęła wzrastać. Ekspresja mRNA chemokiny RANTES wzrosła 8000 razy względem kontroli w pierwszych 29 godzinach stymulacji, po czym gwałtownie spadła.







**Rycina 1.** Poziom ekspresji mRNA kodującego IFN- $\beta$ , PKR, OAS-1, RANTES, IL-6, IL-8 przez komórki HMVEC-L stymulowane poli(I:C), oceniany wobec kontroli. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM, n = 3/4. \*p $\leq$ 0.05.

Ekspresja mRNA białek przeciwwirusowych OAS-1 i PKR znacznie wzrosła i utrzymywała się na wysokim poziomie przez cały czas stymulacji. W poziomie ekspresji mRNA kodującego IFN- $\beta$  wykazano znaczne wahania. Ekspresja mRNA IFN- $\beta$  była najwyższa w punkcie T29 h, zaś najniższa w punkcie T72 h. Stymulacja poli(I:C) skutkowała wysokim wzrostem ekspresji mRNA kodującego zarówno cytokiny prozapalne, jak i białka przeciwwirusowe.

### Dyskusja

Ludzki śródbłonek mikronaczyniowy płuc to warstwa komórek wyściełających wnętrze naczyń krwionośnych i limfatycznych [1]. Badany w pracy śródbłonek w organizmie zlokalizowany jest w bliskim sąsiedztwie nabłonka oskrzelowego i warstwy nabłonkowej pęcherzyków płucnych często wystawionych na działanie patogenów, w tym wirusów oddechowych. Odgrywa kluczową rolę w mechanizmie diapedezy, umożliwiając migrację komórek odpornościowych do miejsca reakcji zapalnej [10,26,27]. Wykazuje wysoką ekspresję wielu cytokin prozapalnych, m.in. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, chemokin – IL-8, RANTES, eotaksyny, a także interferonów i cytokin regulatorowych [2–6]. Cytokiny produkowane przez śródbłonek stanowią ważny element zarówno fizjologicznej odpowiedzi odpornościowej, jak i patogenyzy wielu schorzeń, w tym astmy czy reumatoidalnego zapalenia stawów [28,29].

Wykazano, że w warunkach *in vitro* śródbłonek naczyń płucnych człowieka może być infekowany przez wirusy oddechowe [3–6,8,10]. Do tej pory niewiele jest doniesień literaturowych o roli śródbłonek naczyniowego w rozwoju odpowiedzi zapalnej i przeciwwirusowej w przebiegu infekcji dróg oddechowych wirusami oddechowymi, takimi jak HRV, ludzkie koronawirusy, czy syncytialny wirus oddechowy. Dowiedziono, iż komórki śródbłonek naczyniowego wykazują ekspresję wielu receptorów PRR w tym receptora TLR3 którego ligandem jest dsRNA [10,30–34].

Ze względu na możliwość infekowania komórek śródbłonka naczyniowego przez wirusy oddechowe, a zatem ich potencjalnej ekspozycji na wirusowe RNA zdecydowano o zbadaniu potencjału komórek śródbłonka naczyniowego płuc do odpowiedzi zapalnej i przeciwwirusowej po stymulacji śródbłonka z wykorzystaniem poli(I:C). Jako cytokiny istotne w odpowiedzi zapalnej wybrano IL-6, IL-8 oraz chemokinę RANTES. W przypadku oszacowania potencjału odpowiedzi przeciwwirusowej komórek śródbłonka wybrano IFN- $\beta$  oraz zależne od IFN- $\beta$  przeciwwirusowe białka wewnątrz-komórkowe – OAS-1 i PKR [35–37].

W przypadku stymulacji komórek śródbłonka poli(I:C) wykazano wzrost ekspresji mRNA kodującego cytokiny prozapalne w większości punktów czasowych. Dla wszystkich cytokin prozapalnych, a także dla IFN- $\beta$ , poziom ekspresji mRNA był szczególnie wysoki w 29 godzinie stymulacji. Ekspresja mRNA chemokiny RANTES wzrosła 8000 razy względem kontroli w pierwszych 29 godzinach stymulacji, po czym gwałtownie spadła. Tak wysoka ekspresja mRNA chemokiny RANTES pokrywa się z wynikami uzyskanymi podczas badań opublikowanych w 2021 roku przez Chałubińskiego i in., wykonanych na modelu śródbłonka infekowanego wirusem HRV16, dla którego wykazano wówczas wzrost ekspresji białka RANTES o około 300 razy [4]. Znaczne wzrosty ekspresji IL-6, IL-8 i białka RANTES po stymulacji poli(I:C) wykazano także w innych badaniach [25,38–40]. Co więcej komórki śródbłonka po aktywacji poli(I:C) (przy takim samym stężeniu agonisty) wykazują około 20 krotnie większą ekspresję mRNA chemokiny RANTES niż limfocyty T pomocnicze [41]. Co ciekawe, choć ekspresja IL-8 przez komórki nabłonka oddechowego stymulowane poli(I:C) osiągnęła podobny poziom, to ekspresja IL-6 znacznie przekraczała wartości uzyskane w naszych badaniach, wzrastając nawet tysiąckrotnie [40]. W przypadku infekcji komórek HMVEC-L wirusem HRV16 zaobserwowano znacznie większy wzrost ekspresji mRNA IL-6 i IL-8 w punkcie T24 h, względem uzyskanych przez nas wyników. W innych badaniach wykazano, że w przypadku makrofagów człowieka blokowanie receptora TLR3, przy jednoczesnej stymulacji poli(I:C), doprowadziło do istotnego spadku ekspresji IL-6 [42]. Warto nadmienić, iż blokowanie powierzchniowego receptora TLR3 w przypadku ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego skutkowało aż 60% obniżeniem ekspresji cytokin prozapalnych [43].

Można domniemywać, iż TLR3 stanowi kluczowy receptor indukujący odpowiedź prozapalną i przeciwwirusową komórek HMVEC-L.

Ekspresja mRNA kodującego IFN- $\beta$  była najwyższa w punkcie T29 h, zaś najniższa w punkcie T72 h. Ekspresja mRNA białek przeciwwirusowych OAS-1 i PKR znacznie wzrosła i utrzymywała się na wysokim poziomie przez cały czas stymulacji, a uzyskane wyniki są zbliżone do wyników uzyskanych przez Chałubińskiego i in. w przypadku infekcji śródbłonka wirusem HRV16 – około dziesięciokrotny wzrost mRNA dla PKR, około 250 krotny wzrost mRNA dla OAS-1 [10]. Wyniki stymulacji komórek z użyciem poli(I:C) pokrywają się często z wynikami uzyskiwanymi w komórkach infekowanych wirusami RNA m.in. HRV16, a także wirusem grypy [4,38].

Stymulacja poli(I:C) skutkowała wysokim wzrostem ekspresji mRNA kodującego zarówno cytokiny prozapalne, jak i białka przeciwwirusowe. Potwierdziłmy, że poli(I:C) jest skutecznym stymulatorem komórek HMVEC-L.

Uzyskane obecnie wyniki, wraz z wynikami uzyskanymi przez zespół Chałubińskiego w poprzednich latach [3–8], mogą świadczyć o wysokim potencjale komórek śródbłonka do indukowania odpowiedzi zapalnej i przeciwwirusowej w odpowiedzi na komponenty wirusowe, jako iż poli(I:C) stanowi syntetyczny analog dsRNA i powszechnie wykorzystywany jest w warunkach *in vitro*, aby imitować infekcję wirusową. TLR3, dla którego poli(I:C) stanowi jeden z ligandów, jest receptorem licznie reprezentowanym przez komórki HMVEC-L [10,18]. Wysoka ekspresja TLR3 może świadczyć o ewolucyjnym przystosowaniu komórek śródbłonka do wykrywania wirusów i uczestniczeniu śródbłonka naczyń płucnych w generowaniu odpowiedzi przeciwwirusowej i zapalnej w przebiegu infekcji wirusowych dróg oddechowych człowieka. Wyniki uzyskane w tej pracy mogą przyczynić się do zrozumienia roli śródbłonka naczyniowego w odpowiedzi immunologicznej. Mogą również posłużyć do stworzenia nowych modeli badawczych z wykorzystaniem komórek śródbłonka, a w przyszłości pomóc w opracowywaniu skutecznych terapii chorób przewlekłych, w których śródbłonek odgrywa istotną rolę.

**Bibliografia:**

1. Stevens T, Phan S, Frid MG, Alvarez D, Herzog E, Stenmark KR. Lung vascular cell heterogeneity: endothelium, smooth muscle, and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc.* 15 wrzesień 2008;5(7):783–91.
2. Branchett WJ, Lloyd CM. Regulatory cytokine function in the respiratory tract. *Mucosal Immunology.* maj 2019;12(3):589–600.
3. Gajewski A, Gawrysiak M, Szewczyk R, Gulbas I, Likońska A, Michlewska S, i in. IL-33 augments the effect of rhinovirus HRV16 on inflammatory activity of human lung vascular endothelium-possible implications for rhinoviral asthma exacerbations. *Allergy.* lipiec 2021;76(7):2282–5.
4. Chałubiński M, Szulc A, Pawełczyk M, Gajewski A, Gawrysiak M, Likońska A, i in. Human rhinovirus 16 induces antiviral and inflammatory response in the human vascular endothelium. *APMIS.* marzec 2021;129(3):143–51.
5. Likońska A, Gawrysiak M, Gajewski A, Klimczak K, Michlewska S, Szewczyk R, i in. Human lung vascular endothelium may limit viral replication and recover in time upon the infection with rhinovirus HRV16. *APMIS.* listopad 2022;130(11):678–85.
6. Gulbas I, Gajewski A, Gawrysiak M, Szewczyk R, Likońska A, Michlewska S, i in. IL-33 prevents the enhancement of AP-N, DPP4, and ACE2 expression induced by rhinovirus HRV16 in the human lung endothelium-potential implications for coronaviral airway infections. *Allergy.* maj 2022;77(5):1610–3.
7. Chałubiński M, Gajewski A, Kowalski ML. The relationship between human coronaviruses, asthma and allergy—An unresolved dilemma. *Clin Exp Allergy.* październik 2020;50(10):1122–6.
8. Gawrysiak M, Gajewski A, Szewczyk R, Likońska A, Michlewska S, Chmiela M, i in. Human rhinovirus HRV16 impairs barrier functions and regeneration of human lung vascular endothelium. T. 76, *Allergy.* 2021. s. 1872–5.
9. Bugatti A, Filippini F, Bardelli M, Zani A, Chiodelli P, Messali S, i in. SARS-CoV-2 Infects Human ACE2-Negative Endothelial Cells through an  $\alpha v \beta 3$  Integrin-Mediated Endocytosis Even in the Presence of Vaccine-Elicited Neutralizing Antibodies. *Viruses.* 29 marzec 2022;14(4):705.
10. Chałubiński M, Szulc A, Pawełczyk M, Gajewski A, Gawrysiak M, Likońska A, i in. Human rhinovirus 16 induces antiviral and inflammatory response in the human vascular endothelium. *APMIS.* 20201215. wyd. marzec 2021;129(3):143–51.
11. Khakpour S, Wilhelmsen K, Hellman J. Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun.* listopad 2015;21(8):827–46.
12. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 20210804. wyd. sierpień 2021;6(1):291.
13. Jang JH, Shin HW, Lee JM, Lee HW, Kim EC, Park SH. An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp. *Mediators of Inflammation.* 2015;2015:1–12.
14. Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 24 maj 2002;293(5):1364–9.
15. Mielcarska MB, Bossowska-Nowicka M, Toka FN. Cell Surface Expression of Endosomal Toll-Like Receptors—A Necessity or a Superfluous Duplication? *Front Immunol.* 1 luty 2021;11:620972.
16. Lam LKM, Murphy S, Kokkinaki D, Venosa A, Sherrill-Mix S, Casu C, i in. DNA binding to TLR9 expressed by red blood cells promotes innate immune activation and anemia. *Sci Transl Med.* 20211020. wyd. 20 październik 2021;13(616):eabj1008.
17. Sartorius R, Trovato M, Manco R, D'Apice L, De Berardinis P. Exploiting viral sensing mediated by Toll-like receptors to design innovative vaccines. *NPJ Vaccines.* 20211028. wyd. 28 październik 2021;6(1):127.
18. Khakpour S, Wilhelmsen K, Hellman J. Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun.* listopad 2015;21(8):827–46.
19. Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem.* 20040116. wyd. 26 marzec 2004;279(13):12542–50.
20. Zheng X, Li S, Yang H. Roles of Toll-Like Receptor 3 in Human Tumors. *Front Immunol.* 27 kwiecień 2021;12:667454.
21. Slater L, Bartlett NW, Haas JJ, Zhu J, Message SD, Walton RP, i in. Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium. *PLoS Pathog.* 20101104. wyd. listopad 2010;6(11):e1001178.
22. Bortolotti D, Gentili V, Rizzo S, Schiuma G, Beltrami S, Strazzabosco G, i in. TLR3 and TLR7 RNA Sensor Activation during SARS-CoV-2 Infection. *Microorganisms.* 26 sierpień 2021;9(9):1820.
23. Komal A, Noreen M, El-Kott AF. TLR3 agonists: RGC100, ARNAX, and poly-IC: a comparative review. *Immunol Res.* sierpień 2021;69(4):312–22.
24. Park H, Adamson L, Ha T, Mullen K, Hagen SI, Nogueron A, i in. Polyinosinic-polycytidylic acid is the most effective TLR adjuvant for SIV Gag protein-induced T cell responses in nonhuman primates. *J Immunol.* 20130315. wyd. 15 kwiecień 2013;190(8):4103–15.
25. Lever AR, Park H, Mulhern TJ, Jackson GR, Comolli JC, Borenstein JT, i in. Comprehensive evaluation of poly(I:C) induced inflammatory response in an airway epithelial model. *Physiol Rep [Internet].* kwiecień 2015;3(4). Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25847914>
26. Krüger-Genge, Blocki, Franke, Jung. *Vascular Endothelial Cell Biology: An Update.* *IJMS.* 7 wrzesień 2019;20(18):4411.
27. Perkins TN, Oczypok EA, Milutinovic PS, Dutz RE, Oury TD. RAGE-dependent VCAM-1 expression in the lung endothelium mediates IL -33-induced allergic airway inflammation. *Allergy.* styczeń 2019;74(1):89–99.
28. Levy JA. The Unexpected Pleiotropic Activities of RANTES. *The Journal of Immunology.* 1 kwiecień 2009;182(7):3945–6.

29. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 20180201. wyd. luty 2018;10(2). Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28620096>
30. Fitzner N, Clauberg S, Essmann F, Liebmann J, Kolb-Bachofen V. Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. *Clin Vaccine Immunol*. 20071031. wyd. styczeń 2008;15(1):138–46.
31. Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttorp N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost*. 2009;102(12):1103–9.
32. Wang W, Deng M, Liu X, Ai W, Tang Q, Hu J. TLR4 Activation Induces Nontolerant Inflammatory Response in Endothelial Cells. *Inflammation*. grudzień 2011;34(6):509–18.
33. Alekseeva AY, Kameneva LV, Kostyuk SV, Veiko NN. Multiple Ways of cfDNA Reception and Following ROS Production in Endothelial Cells. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;924:127–31.
34. Bai B, Yang Y, Wang Q, Li M, Tian C, Liu Y, i in. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction. *Cell Death Dis*. 20200918. wyd. 18 wrzesień 2020;11(9):776.
35. Ibsen MS, Gad HH, Andersen LL, Hornung V, Julkunen I, Sarkar SN, i in. Structural and functional analysis reveals that human OASL binds dsRNA to enhance RIG-I signaling. *Nucleic Acids Research*. 26 maj 2015;43(10):5236–48.
36. Schwartz SL, Park EN, Vachon VK, Danzy S, Lowen AC, Conn GL. Human OAS1 activation is highly dependent on both RNA sequence and context of activating RNA motifs. *Nucleic Acids Res*. 27 lipiec 2020;48(13):7520–31.
37. Cesaro T, Michiels T. Inhibition of PKR by Viruses. *Front Microbiol*. 20211025. wyd. 2021;12:757238.
38. Ioannidis I, Ye F, McNally B, Willette M, Flaño E. Toll-Like Receptor Expression and Induction of Type I and Type III Interferons in Primary Airway Epithelial Cells. *J Virol*. 15 marzec 2013;87(6):3261–70.
39. Dauletbaev N, Cammisano M, Herscovitch K, Lands LC. Stimulation of the RIG-I/MAVS Pathway by Polyinosinic:Polycytidylic Acid Upregulates IFN- $\beta$  in Airway Epithelial Cells with Minimal Costimulation of IL-8. *The Journal of Immunology*. 15 wrzesień 2015;195(6):2829–41.
40. Hellman S. Generation of equine enteroids and enteroid-derived 2D monolayers that are responsive to microbial mimics. *Vet Res*. 20210814. wyd. 14 sierpień 2021;52(1):108.
41. Meyer T, Oberg HH, Peters C, Martens I, Adam-Klages S, Kabelitz D, i in. poly(I:C) costimulation induces a stronger antiviral chemokine and granzyme B release in human CD4 T cells than CD28 costimulation. *J Leukoc Biol*. 20120702. wyd. październik 2012;92(4):765–74.
42. Grigoryeva LS, Cianciotto NP. Human macrophages utilize a wide range of pathogen recognition receptors to recognize *Legionella pneumophila*, including Toll-Like Receptor 4 engaging *Legionella* lipopolysaccharide and the Toll-like Receptor 3 nucleic-acid sensor. *PLoS Pathog*. 20210719. wyd. lipiec 2021;17(7):e1009781.
43. Duffy KE, Lamb RJ, San Mateo LR, Jordan JL, Canziani G, Brigham-Burke M, i in. Down modulation of human TLR3 function by a monoclonal antibody. *Cell Immunol*. sierpień 2007;248(2):103–14.