

Tiểu đơn vị PB2 của vi-rút cúm A RNA polymerase là

Nhập vào Ma trận ty thể

Joshua C. D. Long, Ervin Fodor

Trường Bệnh học Sir William Dunn, Đại học Oxford, Oxford, Vương quốc Anh

TÓM TẮT

Tiểu đơn vị polymerase cơ bản 2 (PB2) của phức hợp RNA polymerase của vi rút cúm A theo mùa ở người đã được chứng minh là khu trú vào ti thể. Nhiều vai trò khác nhau, bao gồm điều hòa quá trình apoptosis và các phản ứng miễn dịch bẩm sinh đối với truyền nhiễm virus, đã được đề xuất cho PB2 ty thể. Đặc biệt, PB2 đã được chứng minh là có khả năng ức chế sự biểu hiện của interferon bằng cách kết hợp với protein tín hiệu kháng vi-rút (MAVS) của ty thể, hoạt động theo chiều xuôi của RIG-I và MDA-5 trong interferon.con đường cảm ứng. Tuy nhiên, mặc dù ngày càng có nhiều tài liệu về vai trò tiềm năng của PB2 trong ty thể, lượng chính xác của PB2 trong ty thể vẫn chưa được xác định. Ở đây, chúng tôi đã sử dụng peroxidase ascorbate tăng cường (APEX) được gắn thẻ pro teins PB2 và kính hiển vi điện tử để nghiên cứu vị trí của PB2 trong ty thể. Chúng tôi thấy rằng PB2 được nhập vào mitochon dria, nơi nó bản địa hóa thành ma trận ty thể. Chúng tôi cũng chứng minh rằng MAVS không cần thiết để nhập PB2 vào ti thể bằng cách cho thấy PB2 liên kết với ti thể trong nguyên bào sợi của phôi chuột MAVS loại trực tiếp. Thay vào đó, chúng tôi nhận thấy rằng dư lượng axit amin 9 trong trình tự nhắm mục tiêu của ty thể ở đầu N là yếu tố quyết định cổng PB2 của ty thể, phân biệt sự định vị của PB2 ở người với của các chủng vi rút cúm gia cầm A. Chúng tôi cũng cho thấy rằng một vi rút mã hóa PB2 không đơn cực bị suy giảm trong nguyên bào sợi phôi chuột (MEFs) so với vi rút isogenic mã hóa PB2 ty thể, theo cách độc lập với MAVS, gợi ý vai trò của PB2 trong chất nền ty thể. Đây công việc mở rộng sự hiểu biết của chúng ta về sự tác động lẫn nhau giữa vi rút cúm và ty thể.

TẦM QUAN TRỌNG

Tiểu đơn vị PB2 của RNA polymerase của virus cúm là yếu tố chính quyết định khả năng gây bệnh của virus. Tuy nhiên, phân tử các cơ chế về cách PB2 xác định khả năng gây bệnh vẫn chưa được hiểu rõ. PB2 liên kết với ty thể và ức chế chức năng của protein truyền tín hiệu kháng vi-rút MAVS của ty thể, liên quan đến PB2 trong việc điều chỉnh tái bảo trợ miễn dịch bẩm sinh. Chúng tôi nhận thấy rằng PB2 được nhập vào chất nền ty thể và cho thấy rằng dư lượng axit amin 9 là yếu tố quyết định nhập ty thể. Sự hiện diện của asparagin hoặc threonine trong hơn 99% vi rút cúm theo mùa ở người trước năm 2009 Các chủng H1N1, H2N2 và H3N2 tương thích với quá trình nhập ty thể, trong khi sự hiện diện của axit aspartic trên 95% của tất cả các loại vi rút cúm gia cầm thì không, dẫn đến sự phân biệt rõ ràng giữa vi rút cúm gia cầm thích nghi ở người và vi rút cúm gia cầm. Này những phát hiện cung cấp những hiểu biết sâu sắc về tác động qua lại giữa vi rút cúm và ty thể và đề xuất các cơ chế mà PB2 có thể ảnh hưởng đến khả năng gây bệnh.

Vi rút nhắm mục tiêu vào các quá trình ti thể trong quá trình lây nhiễm để vi khuẩn tự sao chép (1, 2). Cho rằng ti thể đóng vai trò là trung tâm sản xuất và phân phối năng lượng, apop tosis và các phản ứng miễn dịch bẩm sinh, điều này có lẽ không có gì đáng ngạc nhiên.Ti thể được biết đến nhiều nhất với vai trò của chúng trong quá trình oxy hóa tổng hợp ATP, đòi hỏi sự tạo ra điện thế mem brane ty thể (MMP) qua màng não bên trong ty thể. Tuy nhiên, chúng cũng chứa các chất trung gian gây chết tế bào và tham gia vào cảm ứng biểu hiện cytokine (3, 4).

Một ví dụ về quy trình được điều chế rộng rãi bởi vi rút là cảm ứng của quá trình chết tế bào apoptotic. Bằng cách ức chế sự chết của tế bào, vi rút có thể tăng khả năng sao chép hoặc gây ra độ trễ. Trên mặt khác, vi rút có thể tăng giải phóng virion và phân tán virion bằng cách thúc đẩy quá trình chết của tế bào (1, 2). Sự khởi đầu của quá trình apoptosis là thường được kích hoạt bởi sự thẩm thấu của ty thể màng; một quá trình được kiểm soát bởi họ Bcl-2 của protein. Các vi rút như vi rút viêm gan B và vi rút adenovirus ở người mã hóa các protein điều hòa apoptosis có sự tương đồng Bcl-2 có thể là hoặc pro- hoặc antiapoptotic trong tự nhiên (5, 6). Một mục tiêu khác quá trình là sự cảm ứng của biểu thức interferon (IFN) để đáp ứng nhiễm virus. Interferon kích hoạt trạng thái kháng vi-rút trong tế bào và do đó hạn chế sự sao chép và lây lan của vi rút (7). Con đường cảm ứng interferon phát tín hiệu qua protein tín hiệu kháng vi-rút trong ty thể (MAVS), được tìm thấy ở bên ngoài ty thể màng (8–11). Nhiều loại vi rút hoạt động để làm giảm tín hiệu trong con đường này. Một ví dụ là vi rút viêm gan C, biểu hiện protein gây ra sự phân cắt MAVS và do đó hạn chế interferon phát hành (11). Ngoài ra, các quá trình ti thể như canxi cân bằng nội môi, duy trì MMP và tạo ra các loại oxy phản ứng cũng được phát hiện là bị ảnh hưởng bởI vi rút (2).

Đã nhận ngày 12 tháng 7 năm 2016 Đã nhận ngày 14 tháng 7 năm 2016

Bản thảo được chấp nhận đăng trực tuyến ngày 20 tháng 7 năm 2016

Trích dẫn Long JCD, Fodor E. 2016. Tiểu đơn vị PB2 của RNA vi rút cúm A

polymerase được nhập vào chất nền ty thể. J Virol 90: 8729 –8738.

doi: 10.1128 / JVI.01384-16.

Biên tập viên: S. Schultz-Cherry, Bệnh viện Nghiên cứu Trẻ em St. Jude

Địa chỉ thư từ tới Ervin Fodor, ervin.fodor@path.ox.ac.uk.

Bản quyền © 2016 Long and Fodor. Đây là một bài báo truy cập mở được phân phối

theo các điều khoản của giấy phép Creative Commons Attribution 4.0 International.

Protein polymerase cơ bản 2 (PB2) là thành phần của phức hợp RNA polymerase phụ thuộc RNA của virus influenza A cùng với he polymerase cơ bản 1 (PB1) và protein polymerase có tính axit (PA) đơn vị con (12, 13). Polymerase của virus thực hiện phiên mã của gen virut và sự sao chép của bộ gen ARN virut trong nhân của các tế bào bị nhiễm (14). Tuy nhiên, PB2 của một số vi rút cúm Các chủng cũng đã được tìm thấy bản địa hóa vào ti thể, không phụ thuộc vào PB1 và ​​PA (15, 16). Một ty thể đầu N trình tự nhắm mục tiêu (MTS) được phát hiện là nguyên nhân gây ra nội địa hóa của ty thể của PB2 (16, 17). Mặc dù trình tự cao bảo tồn trong khu vực này, vị trí 9 cho thấy sự khác biệt trong các virut ảnh hưởng enza A của các vật chủ khác nhau và là yếu tố quyết định sự định vị của màng đệm phân tử của PB2 (15, 18). Hầu hết con người theo mùa trong các chủng vi rút cúm trước năm 2009 H1N1, H2N2 và H3N2 mã hóa PB2 của ty thể với asparagin ở vị trí 9 (N9-PB2) (15). Mặt khác, phần lớn vi rút cúm gia cầm mã hóa PB2 không lưỡng cực với axit aspartic ở vị trí này (D9- PB2). Điều thú vị là đại dịch cúm H1N1 có nguồn gốc từ lợn vi rút xuất hiện trong quần thể người vào năm 2009 mã hóa D9-PB2 không đơn cực, phù hợp với nguồn gốc từ gia cầm của phân đoạn PB2 của những vi rút này (19).

Vị trí chính xác của PB2 tại ti thể vẫn chưa được biết, và ý nghĩa chức năng của việc xác định vị trí của ty thể của PB2 vẫn còn mờ mịt. Vi rút cúm A / WSN / 33 tái tổ hợp biểu hiện PB2 với các đột biến ở L7 và L10 trong MTS, kết xuất PB2 không phải là tín hiệu của PB2, cho thấy sự phát triển giảm trong nuôi cấy tế bào và các mô hình động vật và gây ra nhiều mất MMP hơn, cho thấy rằn PB2 của ty thể có thể góp phần vào việc duy trì chức năng của màng đệm phân bào trong quá trình nhiễm vi rút cúm (16). Hơn nữa nghiên cứu mã hóa vi rút cúm A / WSN / 33 tái tổ hợp ti thể kiểu hoang dã N9-PB2 hoặc phi ti thể đột biến D9-PB2 liên quan đến PB2 trong việc điều chỉnh khả năng kháng virus bẩm sinh của vật chủ các con đường miễn dịch. Đặc biệt, vi rút đột biến mã hóa PB2 không ti thể được phát hiện gây ra mức beta cao hơn trong terferon (IFN-) trong nuôi cấy tế bào và đã bị suy giảm độc lực ở chuột mô hình lây nhiễm (15). Đồng ý với điều này, một đột biến D9N trong PB2 của vi rút H5N1 ở gia cầm, loại vi rút này đẩy PB2 đến chondria mito, dẫn đến tăng độc lực ở chuột (20). Nó đã được đề xuất rằng PB2 có liên quan đến việc điều chỉnh các con đường miễn dịch bẩm sinh bằng cách tương tác với MAVS (15, 21). Trong quá trình lây nhiễm với vi rút cúm, các loài ARN của vi rút được phát hiện bởi tế bào DEAD / hộp helicase RIG-I (22). Điều này dẫn đến việc kích hoạt RIG-I, dẫn đến sự tương tác của nó với MAVS tại ty thể màng ngoài. MAVS được kích hoạt tạo thành tín hiệu có thẩm quyền oligome trên bề mặt ti thể, tương tác với các bộ điều hợp và kinaza hạ nguồn, dẫn đến cảm ứng biểu hiện terferon (23). Đầu N-242-amino-axit (aa) vùng PB2 được cho là chịu trách nhiệm chính cho sự liên kết với MAVS (21, 24). Cả hai dạng chondrial ty thể và không phảimito của PB2 đã được chứng minh là liên kết với MAVS và cả hai dạng đều ức chế biểu hiện IFN khi bị ép quá mức trong tế bào (15, 25).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhằm mục đích nghiên cứu sâu hơn về ty thể sự liên kết của PB2. Chúng tôi cho thấy rằng bản địa hóa của ty thể của PB2 không được trung gian bởi sự liên kết của PB2 với MAVS tương tác PB2 được báo cáo trước đó ở ngoài ty thể màng nhưng bởi một MTS ở đầu cuối N của PB2. MTS thúc đẩy việc nhập PB2 vào ti thể và đặc biệt là vào không gian ma trận ti thể. Chúng tôi cho thấy rằng ty thể PB2 ảnh hưởng đến trạng thái cân bằng hợp nhất / phân hạch của ti thể, dẫn đến đến sự phân mảnh của ti thể và tái tổ hợp vi rút cúm A mã hóa PB2 không đơn cực bị suy giảm độc lực trong nuôi cấy tế bào theo cách thức không phụ thuộc vào MAVS. Những phát hiện làm nổi bật tiềm năng của một chức năng liên quan đến ma trận của PB2 khi nhiễm vi rút cúm.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Plasmid. Plasmid pcDNA-PB2 và pcDNA-PB2-GFP (pcDNA-PB2- protein huỳnh quang xanh lục) biểu hiện PB2 kiểu hoang dã hoặc đột biến N9D của vi rút cúm A / WSN / 33 (H1N1) đã được mô tả trước đây (15, 26, 27). Plasmid biểu hiện PB2 đột biến N9T với đầu C Thẻ GFP được tạo thông qua đột biến hướng vào trang web của pcDNA-PB2- GFP plasmid. Để tạo ra plasmid biểu hiện peroxidase ascorbate (APEX) PB2 được gắn thẻ, trình tự APEX được PCR khuếch đại từ MTS-APEX plasmid (một món quà của Alice Y. Ting, Viện Massachusetts của Công nghệ) (28) và được nối vào plasmid pcDNA-PB2-GFP, đặt lại khung đọc mở GFP. Kính hiển vi huỳnh quang. Nguyên bào sợi phôi chuột (MEF) (a món quà tử tế của Caetano Reis a Sousa, Francis Crick Institute), được tạo ra từ hoặc loại hoang dã hoặc MAVS / chuột, được trồng trên các tấm phủ thủy tinh 6-giếng. Tế bào được truyền với 2,5 g plasmid biểu hiện PB2 hoặc PB2-GFP sử dụng Lipofectamine 2000 theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen). Tế bào được nhuộm ở 24 giờ sau khi truyền nhiễm trong 30 phút với 10 nM Mitotracker Red (Đầu dò phân tử) trong nuôi cấy tế bào môi trường, được rửa trong 2 phút bằng môi trường mới, và cố định bằng môi trường aldehyde-dạng 3,5%. Các tấm phủ được rửa ba lần trong 5 phút trong nước muối đệm phate phos (PBS) và được gắn trong Mowiol. Đối với các thí nghiệm về sự phục hồi của immunofluo, các tế bào Vero phát triển trên các tấm phủ đã được truyền nhiễm với plasmid biểu hiện PB2, nhuộm với 100 nM Mitotracker Red, và đã sửa như mô tả ở trên. Tế bào sau đó bị chặn với 2% thai bò. huyết thanh (FBS) –PBS (đệm chặn) qua đêm ở 4 ° C và sau đó thấm qua băng trong 7,5 phút bằng cách sử dụng 0,2% Triton X-100 –PBS. Tế bào được nhuộm bằng kháng thể đa dòng kháng PB2 ở thỏ (16) và kháng thể thứ cấp chống liên hợp Cy2 trên thỏ (Phòng thí nghiệm miễn dịch Jackson). Các tấm phủ được gắn ở Mowiol và hình ảnh thu được bằng một kính hiển vi Axioplan 2. Phân tích hình ảnh được thực hiện bằng phần mềm Im ageJ. Kính hiển vi điện tử. Tế bào HEK 293T, được truyền ở dạng huyền phù với 1 g plasmid có liên quan bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000, được phát triển trên các tấm phủ nhựa (Thermonox) trong các tấm 24 giếng. MTS-APEX-express tế bào được ủ trong 1 ngày, hoặc tế bào biểu hiện PB2-APEX được ủ trong 2 ngày, được cố định trong dung dịch cố định được làm ấm trước (2,5% formaldehyde, 2% paraformaldehyde, 0,1 M natri cacodylate [pH 7,4], 2 mM CaCl2) cho 1 h. Tế bào được rửa năm lần bằng dung dịch đệm rửa (natri cacodylate 0,1 M [pH 7,4], 2 mM CaCl2) và một lần với dung dịch đệm rửa chứa 1,5 mg / ml glycine, tiếp theo là năm lần rửa trong dung dịch đệm rửa ở 4 ° C. Tế bào được trộn với đệm rửa có chứa 0,5 mg / ml diaminobenzidine và 0,03% H2O2 trong 4 giờ. Tế bào được rửa năm lần với đệm rửa, nhuộm màu với 2% osmium tetroxide, rửa ba lần trong nước cất, và sau đó nhuộm bằng 0,5% uranyl axetat. Các mẫu đã bị khử nước trong điều kiện lạnh giá etanol loạt nồng độ etanol tăng lên 100%. Sau đó, hệ thống thông tin nhựa được hoàn thành với một loạt nhựa được phân loại của nhựa tăng dần nồng độ. Nhựa được để polyme hóa ở 60 ° C trong 48 giờ. Phần được tạo ra bằng cách sử dụng một microtome Leica UC7, gắn trên 200 mắt lưới lưới đồng, và được ủ sau với citrate chì của Reynold. Các phần là được chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử truyền qua Tecnai 12 (TEM) với Máy ảnh thiết bị kết hợp sạc (CCD) Gatan US100. Đo mật độ và phân tích kích thước ty thể được thực hiện bằng ImageJ. Hiệu suất transfec tion đạt được trong tế bào HEK 293T với Lipofectamine 2000 là khoảng 50% đến 60%.

KẾT QUẢ

Việc bản địa hóa ty thể của PB2 không được trung gian bởi sự liên kết của nó với MAVS. Nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng PB2 tương tác với protein màng ngoài ty thể MAVS (15, 21,24), và công việc gần đây đã cung cấp dữ liệu thử nghiệm cho thấy rằng đánh sập MAVS bởi RNA can thiệp nhỏ (siRNA) làm giảm sự liên kết của PB2 với ty thể (29).

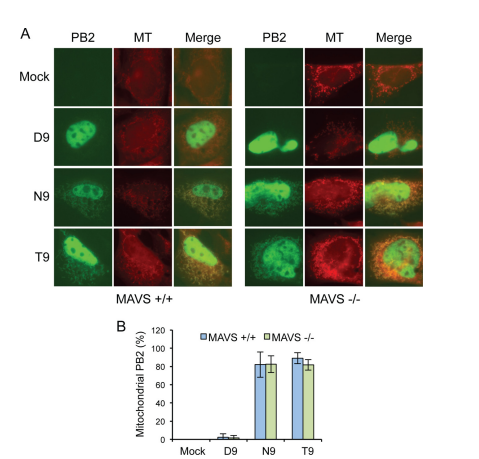


FIG 1 MAVS không bắt buộc đối với việc bản địa hóa PB2 của ty thể. (A) Phân phối di động của PB2 được gắn thẻ GFP với D9, N9 hoặc T9 trong MAVS được truyền / và các ô MAVS / MEF. Tế bào được nhuộm bằng chất đánh dấu ty thể huỳnh quang Mitotracker (MT) và được chụp ảnh bằng kính hiển vi huỳnh quang. (B) Các tế bào biểu hiện PB2 được cho điểm để xác định vị trí của PB2 trong ty thể. Dữ liệu cột thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào biểu hiện PB2 với PB2 ty thể dấu hiệu. Các thanh đại diện cho độ lệch chuẩn của trung bình dữ liệu từ ba thí nghiệm độc lập (n 17 đến 21 ô / thí nghiệm).

Cùng nhau, những kết quả cho thấy rằng liên kết ty thể của PB2 có thể là qua trung gian tương tác của nó với MAVS ở màng khô ngoài ty thể. Tuy nhiên, trong các nghiên cứu khác, cả hai ty thể PB2 và PB2 phi tín hiệu được phát hiện có liên kết với MAVS, cho thấy rằng việc nhắm mục tiêu của ty thể đối với PB2 sẽ làm giảm đi sự tương tác của nó với MAVS (15, 25). Để kiểm tra xem có cần phân tích ciation với MAVS để nhắm mục tiêu ty thể của PB2, chúng tôi đã thể hiện D9-PB2 phi tín hiệu được gắn thẻ GFP hoặc mi tochondrial N9-PB2 trong MEF và MAVS / MEF kiểu hoang dã và xác định vị trí của chúng bằng kính hiển vi huỳnh quang. chúng tôi cũng bao gồm T9-PB2 trong phân tích, khoảng 9% theo mùa trước năm 2009 vi rút cúm người H1N1, H2N2 và H3N2 có mã là T9 chứ không phải là N9 điển hình hơn. Các tế bào đã được nhuộm màu với Mitotracker để xác định màu sắc của PB2 với ti thể. Đúng như dự đoán, trong MEF kiểu hoang dã, cả ba PB2 cho thấy sự bản địa hóa hạt nhân mạnh mẽ (Hình 1A), vì PB2 chứa một trình tự nội địa hóa hạt nhân (30). Như đã báo cáo trước đây (15), không có tín hiệu GFP có thể phát hiện được bên ngoài nhân tế bào thể hiện D9-PB2. Tuy nhiên, cả N9-PB2 và T9-PB2 đều cho thấy nội địa hóa ty thể trong phần lớn các tế bào (Hình 1). Điều này có nghĩa là hơn 99% vi rút cúm theo mùa ở người trước năm 2009 các chủng H1N1, H2N2 và H3N2 mã hóa PB2 tại chỗ của ty thể. Điều này trái ngược với vi rút cúm gia cầm, phần lớn trong số đó mã hóa D9-PB2 phi tín hiệu. Cả N9-PB2 và T9-PB2 đều cho thấy cùng một kiểu hình thành cục bộ ty thể trong MAVS / MEF như trong MEF kiểu hoang dã tương ứng (Hình 1), cho thấy rằng sự tương tác giữa PB2 và MAVS không bắt buộc đối với bản địa hóa của mitochon dria.

**Vị trí 9 kiểm soát việc nhập PB2 vào ti thể**. Do đó, chúng tôi đã điều tra xem những cơ chế nào khác có thể khiến tôi xác định vị trí của PB2 vào ty thể và chính xác là ở đâu quần thể ti thể của PB2 này đã được bản địa hóa. Chúng tôi đã đánh giá thấp rằng axit aspartic ở vị trí 9 của PB2 đã ảnh hưởng đến sự định vị của màng đệm mito bằng cách làm gián đoạn MTS ở đầu N mà nếu không sẽ làm trung gian cho việc nhập PB2 vào ty thể. Vị trí 9 của PB2 được tìm thấy trong một amphipathic đầu cuối N chuỗi xoắn với một số leucine, serines và arginines. Các xoắn ốc lưỡng tính N-termi nal có thể hoạt động như MTS và các protein có các xoắn ốc phipathic cũng đã được tìm thấy để chèn vào đơn lớp phospholipid của giọt lipid hoặc màng lipid (31–36). Để xác định bản địa hóa của submitochondrial của PB2, chúng tôi đã gắn thẻ PB2 với peroxidase ascorbate nâng cao (APEX) thẻ (28). Khi thêm H2O2, APEX xúc tác quá trình trùng hợp oxy hóa của diaminobenzidine (DAB) để tạo ra một chất tiền mã hóa màng không thấm qua liên kết chéo và lắng đọng cục bộ có thể được phát hiện trực tiếp bằng kính hiển vi ánh sáng hoặc sau khi nhuộm, bằng kính hiển vi điện tử.

A picture containing chart

Description automatically generated

HÌNH 2 Thẻ APEX không ảnh hưởng đến sự phân bố di động của PB2 với D9, N9 hoặc T9 trong ô Vero. Tế bào được nhuộm bằng ty thể huỳnh quang đánh dấu Mitotracker (MT) và PB2 được gắn thẻ APEX được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng PB2. Tế bào được chụp ảnh bằng kính hiển vi huỳnh quang.

Sự kết hợp APEX với một mối quan tâm chuyên nghiệp cho phép bản địa hóa suborganelle của protein được xác định. Hình ảnh các tế bào biểu hiện các protein fu sion PB2-APEX với D9, N9 hoặc T9 bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang chống lại PB2 xác nhận rằng thẻ APEX không can thiệp vào bản địa hóa nội bào. Do đó, cả ba protein dung hợp chủ yếu khu trú vào hạt nhân, với N9-PB2 và T9-PB2 cũng bản địa hóa vào ty thể, trong khi không quan sát thấy điểm bản địa hóa ty thể đối với D9-PB2 (Hình 2). Để phân tích bằng kính hiển vi điện tử, các tế bào biểu hiện PB2- Các protein dung hợp APEX được xử lý bằng H2O2 và DAB và nhuộm bằng osmi tetroxide và uranyl axetat. Tất cả các tế bào trước khi ép PB2-APEX hiển thị màu hạt nhân mạnh (Hình 3A). Tuy nhiên, các ô thể hiện N9-PB2-APEX và T9-PB2-APEX cũng hiển thị sự nhuộm màu mạnh mẽ trong ty thể. Không có độ tương phản mạnh đã được quan sát thấy trong các tế bào biểu hiện D9- hoặc N9-PB2s không được gắn thẻ. Vì đánh giá định lượng, các tế bào được chụp ảnh được phân tích bằng cách tính toán sự tương phản của nhân và ti thể của mỗi tế bào so với của tế bào chất của nó. Điểm dữ liệu từ mỗi ô đã được vẽ biểu đồ lên một biểu đồ phân tán của việc tăng độ tương phản hạt nhân (trục x) chống lại tăng độ tương phản của ty thể (trục y) (Hình 3A). Các tế bào biểu hiện D9-PB2 và N9-PB2 không được gắn thẻ biểu hiện ti thể thấp và tương phản hạt nhân. Khi các tế bào được truyền D9- Cấu trúc PB2-APEX, một quần thể tế bào có ti thể thấp và độ tương phản hạt nhân thấp, có khả năng đại diện cho sự không bị lây nhiễm tế bào, đã được quan sát. Tuy nhiên, chúng tôi đã quan sát thấy một quần thể thứ hai các tế bào đã tăng nhuộm nhân mà không liên quan đến nếp gấp trong tương phản ty thể, chứng tỏ sự bản địa hóa của PB2 chỉ với hạt nhân. Một quần thể tế bào tương tự với tăng nhuộm hạt nhân được quan sát thấy trong N9-PB2-APEX- và Quần thể tế bào biểu hiện T9-PB2-APEX; tuy nhiên, những ô này cũng cho thấy sự gia tăng độ tương phản của ty thể. Để kết hợp dữ liệu từ ba thử nghiệm độc lập, hai cửa được sản xuất để sắp xếp các tế bào thành bốn loại dựa trên độ tương phản chondrial mito (thấp hoặc cao) và tương phản hạt nhân (thấp hoặc cao). Các cổng này được đặt để các điểm dữ liệu cho các ô thể hiện N9-PB2 và D9-PB2 không được gắn thẻ được tìm thấy ở góc phần tư độ tương phản thấp / độ tương phản thấp. Một khóa giản đồ giải thích chiến lược gating và loại ô nào được tìm thấy trong mỗi bộ điều kiện được hiển thị (Hình 3A, trên cùng). Đánh giá định lượng này về dữ liệu tiết lộ rằng biểu thức D9-PB2-APEX dẫn đến tăng nhuộm hạt nhân trong khi T9-PB2-APEX và N9-PB2-APEX ex áp lực gây ra tăng nhuộm hạt nhân và ty thể (Hình 3B). Cùng với nhau, dữ liệu chứng minh rằng N9-PB2 và T9- PB2, cũng như chứa một tín hiệu bản địa hóa hạt nhân, cũng kết hợp một MTS để thúc đẩy quá trình nhập của chúng vào ti thể. Cuối cùng, để đánh giá định lượng xem có hay không nhập D9-PB2-APEX vào ti thể, tế bào từ bộ ba các thí nghiệm độc lập được thực hiện cho mỗi cấu trúc được phân loại thành các nhóm tế bào có nhân sáng hoặc tối bằng cách sử dụng gating các thông số được hiển thị trong Hình 3A và sau đó là ti thể trung bình độ tương phản cho mỗi nhóm đã được tính toán. Như mong đợi, các ô có hạt nhân tối biểu hiện N9-PB2-APEX hoặc T9-PB2-APEX có mức độ tương phản ti thể trung bình cao hơn so với các tế bào có hạt nhân nhẹ (Hình 3C). Tuy nhiên, không có sự gia tăng đáng kể tương phản trong ti thể ở tế bào có nhân tối biểu hiện D9- PB2-APEX so với tế bào có nhân nhẹ. Do đó, có không phát hiện được sự nhập D9-PB2 vào ty thể. Tổng hợp lại, những dữ liệu này cho thấy rằng phần lớn PB2 được mã hóa bởi vi rút cúm theo mùa ở người trước H1N1 2009, Các chủng H2N2 và H3N2 được nhập vào ti thể và rằng vị trí 9 của PB2 là yếu tố quyết định cổng im ti thể.

**PB2 được nhập vào chất nền ty thể**. Để xác định vị trí địa phương trình bào của PB2, ti thể đặc trưng cao của tế bào biểu hiện N9-PB2-APEX hoặc T9-PB2- APEX được chụp ảnh ở độ phóng đại cao. Ty thể là được hình thành bởi một cặp hai lớp màng ngăn cách hai vùng. Đầu tiên trong số này, được gọi là không gian ma trận, là khu vực được bao bọc bởi màng trong ti thể và chứa DNA ty thể và ribosome của ty thể. Bên trong màng, có nhiều nếp gấp, chứa các protein của chuỗi vận chuyển electron. Màng trong được bao quanh bởi màng ngoài ty thể, dẫn đến một khoảng trống giữa hai màng gọi là không gian giữa màng. Không gian giữa các màng bao gồm thể tích được hình thành bởi sự xâm nhập trong màng trong được gọi là "cristae" (1, 37). Độ tương phản cao của mi tochondria từ N9-PB2-APEX- và T9-PB2-APEX-express Các tế bào được tìm thấy cho thấy độ tương phản cao trong ma trix ty thể nhưng không phải trong không gian liên màng, như được chỉ ra bởi sự xuất hiện của sự xâm nhập cristae có độ tương phản thấp (Hình 4). Một tương tự mẫu nhuộm được quan sát cho cấu trúc MTS-APEX, được biết là được nhắm mục tiêu đến không gian ma trận ty thể (28). Cùng với nhau, những dữ liệu này cho thấy rằng PB2 được tìm thấy trong không gian ma trận chondrial mito.

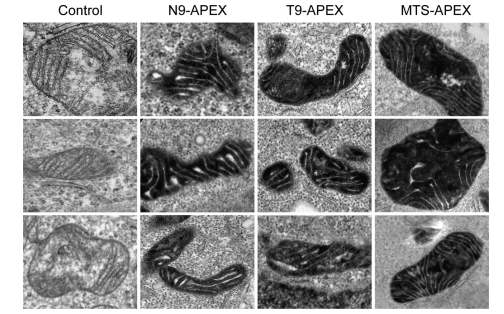
**PB2 ty thể gây ra những thay đổi trong âm vị học của ty thể**. Ti thể của tế bào biểu hiện D9-PB2-APEX, N9- PB2-APEX, T9-PB2-APEX hoặc MTS-APEX đã được phân tích cho thay đổi hình thái bằng cách đo chiều dài tối đa của chúng và khu vực, cũng như bằng cách đếm số lượng của chúng. Phân tích tiết lộ một giảm đáng kể kích thước trung bình của các ti thể có độ tương phản cao được tìm thấy trong các tế bào thể hiện N9-PB2-APEX- hoặc T9-PB2-APEX so với kích thước của các ti thể có độ tương phản thấp được tìm thấy trong Các ô biểu hiện D9-PB2-APEX (Hình 5A, bên trái). Điều này giảm trong kích thước ti thể đi kèm với sự gia tăng trung bình số lượng ty thể trên mỗi tế bào (Hình 5B, bên trái). Những khác biệt này, tuy nhiên, không được quan sát thấy trong các tế bào biểu hiện MTS-APEX liên quan đến các tế bào chưa được truyền nhiễm, cho thấy rằng chúng không phải do nhập thẻ APEX vào ti thể (Hình 5A và B, bên phải). Những quan sát này cho thấy rằng PB2 được nhập vào ma trận chondrial mito phá vỡ sự hợp nhất / cân bằng phân hạch của ty thể, dẫn đến sự phân mảnh ty thể, có thể thông qua việc tạo thành MMP, điều này đã được phát hiện là quan trọng đối với duy trì cân bằng nhiệt hạch / phân hạch (16, 38).

Diagram

Description automatically generated

Hình 3 PB2s với N9 hoặc T9 được nhập vào ti thể. (A) Ô HEK 293T thể hiện PB2 không được gắn thẻ với D9 hoặc N9 hoặc PB2 được gắn thẻ APEX với D9, N9, hoặc T9 được phân tích bằng kính hiển vi điện tử. Biểu đồ phân tán cho thấy kết quả phân tích mật độ đo độ tương phản của ty thể và hạt nhân của các tế bào riêng lẻ so với sự tương phản tế bào chất của chúng. Mỗi điểm đại diện cho một ô duy nhất. Dữ liệu được phân loại thành các loại độ tương phản ty thể thấp và cao (trục y) và thấp và độ tương phản hạt nhân cao (trục x) dựa trên độ tương phản của ti thể và nhân của tế bào biểu hiện PB2 không được gắn thẻ. Một phím biểu đồ hiển thị tiêu đề trục và giá trị cho các biểu đồ phân tán được hiển thị ở trên cùng. Các kiểu hình nhuộm màu của tế bào cho mỗi góc phần tư cũng được hiển thị (trắng, ti thể nhạt / nhân sáng; xanh lam, nhạt ti thể / nhân tối; ti thể màu xanh lục, đậm / nhân sáng; ti thể xám, tối / nhân sẫm màu). N, vị trí của hạt nhân; a.u., đơn vị tùy ý. (B) Phân tích định lượng các tế bào biểu hiện PB2 không được gắn thẻ D9 hoặc N9 hoặc PB2 được gắn thẻ APEX với D9, N9 hoặc T9, được phân loại là có nhân nhẹ (ln) hoặc nhân tối (dn) và ti thể sáng (lm) hoặc ti thể tối (dm), dựa trên sự giao phối được thực hiện như mô tả cho bảng A. Dữ liệu cột đại diện tỷ lệ phần trăm của các tế bào biểu hiện PB2 được chỉ định thuộc các loại nhuộm được chỉ định. Các thanh đại diện cho độ lệch chuẩn của dữ liệu trung bình từ ba các thí nghiệm độc lập. Dấu hoa thị cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các mẫu (thử nghiệm t một mẫu; \*\*, P 0,01). (C) So sánh các tín hiệu ti thể của các tế bào có hạt nhân sáng (ln) hoặc tối (dn) thể hiện PB2 được chỉ định, dựa trên việc kiểm soát được thực hiện như được mô tả cho bảng A. Dữ liệu cột thể hiện mức trung bình dữ liệu tương phản ti thể từ mỗi quần thể. Các thanh đại diện cho độ lệch chuẩn của trung bình dữ liệu tương phản từ ba thí nghiệm độc lập. Dấu hoa thị cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các mẫu (thử nghiệm t một mẫu; \*\*, P 0,01; \*, P 0,05; ns, P 0,05).

**Vi rút cúm A tái tổ hợp mã hóa PB2 khô không đơn cực sẽ sao chép thành hiệu giá thấp hơn trong nuôi cấy tế bào theo cách thức độc lập MAVS.** Để điều tra tầm quan trọng của mito chondrial PB2 đối với sự phát triển của virus trong nuôi cấy tế bào, chúng tôi đã lây nhiễm MEFs loại hoang dã với cúm A tái tổ hợp A / WSN / 33 (H1N1). vi rút mã hóa ti thể kiểu hoang dã N9-PB2 (N9-WSN) hoặc đột biến D9-PB2 (D9-WSN) phi tín hiệu, và động học phát triển của hai loại virus đã được phân tích. Hơn nữa, để phân biệt bất kỳ tác động nào do tương tác gây ra của PB2 với MAVS hoặc bản địa hóa vào ma trix ty thể, chúng tôi cũng phân tích động học phát triển của hai loại virus trong MAVS / MEF. Phân tích cho thấy rằng vi rút N9-WSN kiểu hoang dã đã nhân lên với hiệu giá cao hơn so với D9-WSN đột biến. virus ở cả kiểu hoang dã và MAVS / MEFs (Hình 6).



Hình 4 PB2 được nhập vào ma trận ty thể. Các tế bào HEK 293T thể hiện PB2 được gắn thẻ APEX với dữ liệu N9 hoặc T9 hoặc MTS-APEX được phân tích bằng kính hiển vi điện tử. Ba hình ảnh đại diện của ti thể được hiển thị cho mỗi cấu trúc.

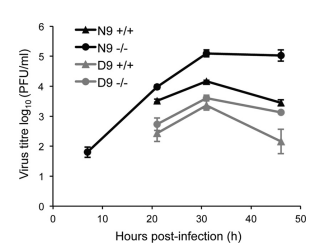
Một cách thú vị, người ta cũng thấy rằng việc loại bỏ MAVS đã thúc đẩy bản sao của N9-WSN nhưng không phải của D9-WSN (Hình 6). Này những quan sát đầu tiên cho thấy rằng sự biểu hiện của ti thể PB2 bản địa hóa ma trận thúc đẩy sự nhân lên của vi rút cúm A trong tế bào động vật có vú. Thứ hai, do N9-WSN cũng được xếp hạng cao hơn D9-WSN trong MAVS / MEF, dữ liệu gợi ý rằng sự khác biệt giữa N9-WSN và D9-WSN không phải là chỉ do mức độ cảm ứng interferon có thể có khác biệt bởi hai loại virus. Tóm lại, trong tế bào động vật có vú, sự phát triển của ma trận ty thể bản địa hóa PB2 thúc đẩy quá trình tái sinh của vi rút cúm A theo cách khác biệt với vai trò của PB2 trong việc ngăn chặn cảm ứng IFN thông qua tương tác của nó với MAVS.

Chart, bar chart

Description automatically generated

Hình 5 Ti thể của tế bào biểu hiện PB2 ti thể cho thấy kích thước giảm và số lượng tăng lên so với tế bào biểu hiện PB2 không ti thể.

Ti thể từ các tế bào biểu hiện PB2 được gắn thẻ APEX với D9, N9 hoặc T9 hoặc MTS-APEX hoặc từ các tế bào chưa được truyền nhiễm (Đối chứng) được phân tích bằng cách đo đường kính lớn nhất và diện tích mặt cắt ngang (A) và bằng cách đếm số lượng của chúng trên mỗi ô (B). Đối với PB2 được gắn thẻ APEX với D9, N9 hoặc T9, 75 đến 200 ty thể từ 13 đến 15 ô cho mỗi điều kiện được phân tích (bảng bên trái). Dữ liệu cột biểu thị độ dài ti thể tương đối hoặc dữ liệu diện tích (A) hoặc số lượng ti thể trên mỗi ô (B) từ ba thử nghiệm độc lập, với dữ liệu được chuẩn hóa dựa trên D9-PB2-APEX. Thanh thể hiện độ lệch chuẩn. Dấu hoa thị biểu thị một sự khác biệt giữa mẫu được đánh dấu và mẫu D9 tương ứng (thử nghiệm t một mẫu; \*\*, P< 0,01). Đối với MTS-APEX và các ô chưa được truyền (Kiểm soát), 94 và 67 ty thể từ 9 và 7 tế bào tương ứng được phân tích (bảng bên phải). Dữ liệu cột đại diện cho chiều dài hoặc diện tích ti thể (A) hoặc ti thể số trên mỗi ô (B). Thanh thể hiện độ lệch chuẩn.



Hình 6 Vi-rút cúm A mã hóa PB2 đột biến không đơn bào sẽ sao chép để giảm hiệu giá trong MEF theo cách thức độc lập với MAVS. MEF kiểu hoang dã (+/+) hoặc MEF loại trực tiếp MAVS (-/-) bị nhiễm loại hoang dã Virus A / WSN / 33 biểu hiện PB2 (N9) ty thể hoặc một gen đột biến vi rút biểu hiện PB2 không đơn cực (D9) ở mức độ lây nhiễm đa dạng (MOI) là 0,01 và được ủ ở 37 ° C. Phần lớn chất nổi trên tế bào được thực hiện ở thời điểm 7, 21, 32 và 46 giờ sau khi gây nhiễm, sau đó là xét nghiệm mảng bám trong tế bào thận bò Madin Darby (MDBK). Điểm dữ liệu đại diện cho mức độ lan truyền trung bình hiệu giá từ ba bệnh nhiễm trùng; các thanh thể hiện độ lệch chuẩn.

THẢO LUẬN

Trong bài báo này, chúng tôi báo cáo rằng vi rút cúm PB2 polymerase tiểu đơn vị bắt màu với ti thể được nhập vào ma trận ty thể. Chúng tôi nhận thấy rằng việc sử dụng kính hiển vi điện tử và các teins PB2 pro được kết hợp với một thẻ APEX, tạo ra một sản phẩm không có màng, có thể bị dính kim loại nặng. rằng PB2 của ty thể được nhắm mục tiêu đến chất nền của ty thể. Chúng tôi cũng nhận thấy rằng axit amin 9 là một yếu tố quyết định đến việc nhập khẩu PB2 vào chất nền ty thể. Cả N9 và T9 đều tương thích với việc nhắm mục tiêu ma trận ty thể của PB2, trong khi có tính axit axit amin D9 không. Với sự phổ biến của các axit amin này tồn dư trong các phân lập vi rút cúm, những kết quả này cho thấy rằng PB2 của hơn 99% tổng số con người H1N1, H2N2 theo mùa trước năm 2009, và vi rút cúm H3N2 được nhắm mục tiêu đến trix ti thể. Mặt khác, đại đa số (hơn 95%) gia cầm vi rút cúm mã hóa D9-PB2 không đơn cực (18). Thật kỳ lạ, PB2 không phải là protein của virus cúm A duy nhất được nhắm mục tiêu theo cấp số nhân tới ty thể. Bản địa hóa của PB1-F2, một protein virus phụ trợ đã được chứng minh là gây ra quá trình chết rụng theo cách phụ thuộc vào loại tế bào, thúc đẩy quá trình viêm và khôi phục hoạt động polymerase của virus ulate (39–41), cũng khác nhau giữa các chủng virus ảnh hưởng enza A. Hầu hết các vi-rút cúm A đều mã hóa toàn thời gian 87-đến-90-aa PB1-F2 liên kết với ti thể do sự hiện diện của MTS trong nửa đầu cuối C của PB1-F2. Tuy nhiên, tất cả vi rút H1N1 trước năm 2009 ở người được phân lập sau năm 1947 mã hóa một phiên bản không đơn cực, dài 57 aa, do sự hiện diện của của một mã mã hóa dừng, trong khi vi rút H1N1 đại dịch 2009 và dòng cúm người H1N1 theo mùa tái phát lại mã hóa một ký hiệu 11-aa bị cắt ngắn phiên bản (41, 42). Những quan sát này ủng hộ ý kiến ​​cho rằng mito chondria là mục tiêu tích cực của vi rút cúm A, qua trung gian protein virut PB2 và PB1-F2, và có thể có sự khác biệt áp lực tiến hóa đối với việc điều chỉnh chức năng ti thể giữa các chủng virus khác nhau và giữa người và gia cầm vật chủ.

Chúng tôi cũng chỉ ra rằng tương tác của PB2 với MAVS không phải là yếu tố quyết định sự liên kết ty thể của nó; PB2 của vi rút cúm hu man theo mùa cho thấy cùng một kiểu ti thể bản địa hóa trong các ô loại trực tiếp MAVS như trong các ô điều khiển biểu hiện MAVS. Nếu PB2 không được tuyển chọn vào ty thể thông qua liên kết với MAVS, các câu hỏi nảy sinh liên quan đến việc sử dụng các khe cơ học nào khác để nhắm mục tiêu PB2 đến ti thể và nó hoạt động như thế nào nhập vào ma trận ti thể. Nhóm chúng tôi đề xuất rằng chuỗi xoắn N-terminal của PB2 hoạt động như một MTS có chứa số lượng phí nhựa axit amin kỵ nước và tích điện dương, dấu hiệu của các xoắn lưỡng tính liên quan đến việc nhắm mục tiêu khô ty thể (16). Thật vậy, đột biến của hai loại nhựa kỵ nước, L7 và L10, đã được tìm thấy để ức chế PB2 ty thể nội địa hóa và dư lượng axit amin dành riêng cho vật chủ ở vị trí 9 là một yếu tố quyết định vị trí của ty thể, gợi ý mạnh mẽ về vai trò quan trọng đối với đầu cuối N của PB2 trong chất nền ty thể nhắm mục tiêu. Các protein nền ty thể được dịch mã trong tế bào chất được nhắm mục tiêu đến translocase của màng ngoài (TOM) phức hợp, hoạt động như một cổng vào chung cho protein nhập vào ti thể bằng cách trung gian chuyển protein vào không gian liên màng. Sau khi đi qua TOM chan nel, các protein dành cho chất nền ty thể được nhập vào bởi translocase của phức hợp TIM23 màng trong và giải phóng vào ma trận (43). Gần đây, nhóm của chúng tôi đã xác định một nhiều loại chaperones và protein ty thể, bao gồm Tom22 và Tim50, tương tác với PB2 từ các tế bào bị nhiễm vi rút cúm (44). Tom22 là một phần của tổ hợp TOM, và nó trực tiếp nhận ra mặt ưa nước của MTS và tạo điều kiện sự vận chuyển của protein hàng hóa thông qua một kênh được hình thành bởi Tom40, một tiểu đơn vị khác của TOM, xuyên qua ty thể bên ngoài màng. Tim50 là một phần của tổ hợp TIM23 và hoạt động như một thụ thể chính cho các protein được phân phối bởi phức hợp TOM. Nó làm trung gian chuyển protein về phía lỗ chuyển vị được hình thành bởi Tim23 ở màng trong ti thể. Do đó chúng tôi đề xuất rằng PB2 được phân phối tới ty thể với sự hỗ trợ của các chaperones Hsp70 và Hsp90 (44–47) và chuyển vị trí vào chất nền ty thể sau đó được trung gian bởi Tom22 và Tim50 của con đường nhập khẩu ti thể. Bao giờ hết, các nghiên cứu sâu hơn được yêu cầu để giải quyết chính xác vấn đề những cơ chế nào hoạt động trong việc vận chuyển PB2 vào ma trận sợi dây mi đến sợi dây chuyền.

Phát hiện rằng PB2 được nhập vào ma trix ti thể đặt ra các vấn đề sâu hơn về ý nghĩa chức năng của liên kết ti thể của PB2. Khi PB2 được nhập vào ma trận ti thể, PB2 ti thể không có khả năng gây trở ngại với chức năng MAVS bằng cách liên kết trực tiếp với nó như đã gọi trước đó (15). Mặc dù cả hai dạng khô trong ti thể và không phải của PB2 đều được phát hiện là có khả năng ức chế qua trung gian MAVS IFN- biểu thức (25), công việc trước đây của nhóm chúng tôi đã đề xuất Tuy nhiên, sự liên kết ty thể của PB2 là một yếu tố quan trọng trong việc xác định ảnh hưởng của nó đối với sự biểu hiện IFN-. Trong ticular, một dạng PB2 của ty thể có thể ức chế IFN- biểu hiện ở một mức độ lớn hơn so với dạng phi tín hiệu (15). Để hỗ trợ điều này, một loại vi rút cúm tái tổ hợp mã hóa PB2 không ti thể đã gây ra biểu hiện IFN- trong tế bào cao hơn nuôi cấy và làm giảm độc lực ở chuột mô hình lây nhiễm (15). Những quan sát này cho thấy rằng sự liên kết khô trong ti thể của PB2 là một yếu tố quan trọng có thể ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và khả năng gây bệnh.

PB2 có thể bản địa hóa vào ma trận ty thể ảnh hưởng như thế nào? Chức năng MAVS và các phản ứng miễn dịch bẩm sinh? PB2 có thể tương tác với chức năng MAVS bằng cách ảnh hưởng đến MMP, theo cách tương tự như được đề xuất cho protein PB1-F2 của virus cúm A, cũng là nhắm mục tiêu đến ty thể và ức chế biểu hiện inter feron qua trung gian MAVS bằng cách giảm MMP (48). PB1-F2, được nhập vào không gian liên màng ty thể, gây ra sự khử cực của MMP hoặc bằng cách trực tiếp tạo ra các lỗ màng (49) hoặc bằng cách kết hợp với ANT3 / VDAC (50). Bảo trì MMP nguyên vẹn là quan trọng đối với sản xuất interferon qua trung gian MAVS (51), và PB1-F2 đã được báo cáo để tăng cường chất đối kháng interferon chức năng của PB2 (48). Thật vậy, công việc trước đây của nhóm chúng tôi đã chỉ ra PB2 trong việc ảnh hưởng đến MMP (16). Hơn nữa, nhóm của chúng tôi đã xác định TUFM như một tương tác của PB2 (44). TUFM, một ty thể protein được bản địa hóa vào chất nền ty thể, đã được báo cáo để điều chỉnh sự biểu hiện interferon do vi rút gây ra phức hợp với NLRX1 (52). Do đó, có thể chất nền ty thể PB2 can thiệp vào chức năng MAVS gián tiếp thông qua ảnh hưởng đến MMP và / hoặc thông qua tương tác của nó với TUFM. Điều thú vị là chúng ta đã làm giảm kích thước ti thể và tăng số lượng chất chondrial trong các tế bào biểu hiện PB2 ty thể ngang bằng với các tế bào biểu hiện dạng không đơn bội. Đây có thể là do PB2 ty thể phá vỡ cân bằng hợp nhất / phân hạch ti thể thông qua ảnh hưởng đến MMP. Giảm MMP có liên quan đến việc ức chế hợp nhất ti thể và tiếp theo là phân mảnh ti thể (38). Mặc dù chúng ta thấy tác dụng rõ ràng của PB2 ty thể đối với kích thước của ti thể, các cơ chế chính xác mà PB2 ảnh hưởng đến MMP và cân bằng nhiệt hạch / phân hạch cũng như bất kỳ ảnh hưởng của PB2 đến chức năng chính của ty thể, oxy hóa quá trình phosphoryl hóa, vẫn chưa rõ ràng và đang chờ các cuộc điều tra thêm.

Chúng tôi cũng đã chứng minh ở đây rằng vi rút cúm A mã hóa một ma trận ty thể bản địa hóa PB2 sao chép lên các hiệu giá cao hơn trong MEF không phải là virus isogenic mã hóa một bản địa hóa không ma trận PB2. Điều này phù hợp với các dữ liệu trước đây cho thấy sự khác biệt tương tự giữa hai loại virus trong mô hình lây nhiễm chuột (15). Tuy nhiên, ở đây chúng tôi cho thấy rằng sự khác biệt này không chỉ do vai trò của PB2 trong việc ức chế sự biểu hiện của interferon, vì nó cũng quan sát thấy trong các tế bào MEF loại trực tiếp MAVS, bị thiếu biểu hiện interferon qua trung gian RIG-I và MDA-5. Chỉ số này ám chỉ rằng PB2 bản địa hóa ma trận ti thể có thể có ảnh hưởng hàng giây, không có tài liệu đối với chức năng của ti thể. quan trọng đối với sự nhân lên của vi rút cúm A. Tuy nhiên, nó cũng có thể rằng hiệu ứng này có thể là do sự khác biệt giữa chức năng của N9-PB2 và D9-PB2 chứa poly merase của virus cúm (15). Ý nghĩa chức năng của việc xác định vị trí trix trong ty thể của PB2 đòi hỏi phải nghiên cứu thêm bằng cách sử dụng các chủng vi rút ent khác nhau thuộc các phân nhóm khác nhau trong cả nuôi cấy tế bào và mô hình động vật.

Gần đây, hai loại protein mới liên quan đến PB2, được biểu hiện trong các tế bào nhiễm virus influencer A, đã được xác định. PB1-S1 được mã hóa bởi một phiên bản ghép nối của mRNA PB2, dẫn đến dạng PB2 bị cắt ngắn theo chiều C-ter có chứa đầu cuối N 495 axit amin của PB2 được hợp nhất thành trình tự 13 axit amin được biểu thị từ một khung đọc mở thay thế (25). Đồng ý với sự hiện diện của MTS cư trú tại ga cuối N của PB2, PB2-S1 đã được báo cáo là khu trú vào ti thể và ức chế IFN - b biểu hiện. PB2 , một protein khác có liên quan đến PB2 chỉ có thể phát hiện được trong các tế bào bị nhiễm một chủng virus cúm gia cầm H5N1 cụ thể, được mã hóa bởi một đoạn PB2 bị lỗi có nội sự xóa bỏ dẫn đến đoạn đầu tận cùng N gồm 71 axit amin của PB2 hợp nhất với trình tự axit amin 19 có nguồn gốc từ khung đọc mở thay thế (29). Điều thú vị là, trái ngược với PB2 và PB2-S1 có độ dài đầy đủ, đoạn PB2 này, cũng liên kết với ty thể, được quan sát để tạo ra biểu hiện IFN-, gây giảm sự nhân lên của virus trong quá trình nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, vi rút đã gây ra mức độ nghiêm trọng của bệnh trong nhiễm trùng chuột mô hình, có thể do sự khuếch đại của hệ miễn dịch bẩm sinh sớm phản hồi. Những kết quả nghiên cứu này càng làm nổi bật tầm quan trọng của PB2 và các dẫn xuất của nó trong việc ảnh hưởng đến các phản ứng miễn dịch bẩm sinh đối với nhiễm vi rút cúm.

Tóm lại, chúng tôi cho thấy ở đây hơn 99% con người theo mùa vi rút cúm A trước các chủng H1N1, H2N2, và H3N2 năm 2009 mã hóa một protein PB2 được nhắm mục tiêu vào chất nền ty thể. Mặc dù PB2 tương tác với MAVS, việc nhắm mục tiêu của nó vào ma trận chondrial mito là độc lập với MAVS. MTS đầu cuối N là chịu trách nhiệm về việc nhắm mục tiêu ma trận ty thể của PB2 và chúng tôi gợi ý rằng PB2 được nhập bằng cách sử dụng ty thể cổ điển con đường nhập khẩu. Báo cáo này nêu bật ti thể tiềm năng các chức năng liên quan đến ma trận của PB2 có thể quan trọng trong sự nhân lên và sinh bệnh học của vi rút cúm A.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi cảm ơn Caetano Reis a Sousa vì loại hoang dã và MAVS / MEF và Alice Y. Ting cho plasmid MTS-APEX. Chúng tôi cũng cảm ơn Errin John con trai của Trường Khoa học Bệnh lý Điện tử Sir William Dunn Cơ sở hỗ trợ với kính hiển vi điện tử và Jane Sharps cho hỗ trợ nuôi cấy tế bào. Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Hội đồng Nghiên cứu Y khoa (MRC) tài trợ chương trình MR / K000241 / 1 (cho E.F.) và một Học sinh MRC (cho J.C.D.L.).

THÔNG TIN TÀI TRỢ

Công việc này, bao gồm cả nỗ lực của Ervin Fodor, được tài trợ bởi Medical

Hội đồng nghiên cứu (MRC) (MR / K000241 / 1). Công trình này, bao gồm pháo đài ef của Joshua Christian David Long, được tài trợ bởi Medical Research

Hội đồng (MRC) (Học sinh).

THAM KHẢO

1. Khan M, Syed GH, Kim SJ, Siddiqui A. 2015. Động lực học ty thể và nhiễm virus: một mối liên hệ chặt chẽ. Biochim Biophys Acta 1853: 2822–2833.

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.040.

2. Anand SK, Tikoo SK. 2013. Virus là bộ điều biến của ty thể chức năng. Adv Virol 2013: 738794.

3. Bhola PD, Letai A. 2016. Ti thể — thẩm phán và kẻ hành quyết tế bào án tử hình. Mol Ô 61: 695–704. http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.019.

4. Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. 2015. Ti thể trong cơ chế điều hòa miễn dịch bẩm sinh và thích nghi. Miễn dịch 42: 406 - 417. http: // dx.doi.org / 10.1016 / j.immuni.2015.02.002.

5. Geng X, Huang C, Qin Y, McCombs JE, Yuan Q, Harry BL, Palmer AE, Xia NS, Xue D. 2012. Protein X của virus viêm gan B nhắm vào protein Bcl-2 để tăng canxi nội bào, cần thiết cho sự nhân lên của virus và làm chết tế bào hướng dẫn. Proc Natl Acad SciUSA 109: 18471–18476. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1204668109.

6. Perez D, White E. 2000. TNF-alpha báo hiệu apoptosis thông qua sự thay đổi cấu trúc phụ thuộc giá thầu trong Bax bị ức chế bởi E1B 19K. Mol Ô 6: 53– 63. http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00013-4.

7. West AP, Shadel GS, Ghosh S. 2011. Ti thể trong miễn dịch bẩm sinh phản hồi. Nat Rev Immunol 11: 389 - 402. http://dx.doi.org/10.1038/ nri2975.

8. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. 2005. VISA là một protein tiếp hợp cần thiết cho tín hiệu IFN-beta do virus kích hoạt. Tế bào Mol 19: 727–740. http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.014.9. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. 2005. Xác định và mô tả đặc điểm của MAVS, một protein tín hiệu kháng vi-rút ty thể kích hoạt NF-kappaB và IRF 3. Ô 122: 669 - 682. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.012.

10. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. 2005. IPS-1, một bộ điều hợp kích hoạt RIG-I- và Cảm ứng interferon loại I qua trung gian Mda5. Nat Immunol 6: 981–988.http://dx.doi.org/10.1038/ni1243.

11. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Barten schlager R, Tschopp J. 2005. Cardif là một protein tiếp hợp trong RIG-I con đường kháng vi-rút và là mục tiêu của vi-rút viêm gan C. Bản chất 437: 1167–1172. http://dx.doi.org/10.1038/nature04193.

12. Ortín J, Martín-Benito J. 2015. Máy tổng hợp RNA của virus RNA sợi nega. Vi-rút học 479 –480: 532–544.

13. Te Velthuis AJ, Fodor E. 11 tháng 7 năm 2016. RNA polymerase của vi rút cúm: hiểu biết về cơ chế tổng hợp RNA của virus. Nat Rev Microbiol 14: 479 - 493. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87.

14. Hutchinson EC, Fodor E. 2013. Vận chuyển bộ gen vi rút cúm từ hạt nhân này sang hạt nhân khác. Vi rút 5: 2424 –2446. http://dx.doi.org/10.3390/ v5102424.

15. Graef KM, Vreede FT, Lau YF, McCall AW, Carr SM, Subbarao K, Fodor E. 2010. Tiểu đơn vị PB2 của RNA polymerase của virus cúm ảnh hưởng đến độc lực bằng cách tương tác với tín hiệu kháng vi rút của ty thể protein và ức chế biểu hiện của beta interferon. J Virol 84: 8433–8445. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00879-10.

16. Carr SM, Carnero E, Garcia-Sastre A, Brownlee GG, Fodor E. 2006. Đặc điểm của tín hiệu nhắm mục tiêu ty thể trong protein PB2 của vi rút cúm. Siêu vi học 344: 492–508. http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2005.08.041.

17. Woodfin BM, Kazim AL. 1993. Tương tác của đầu tận cùng amin của một protein của virus cúm với ty thể. Arch Biochem Biophys 306:427– 430. http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1993.1533.

18. Miotto O, Heiny A, Tan TW, August JT, Brusic V. 2008. Nhận dạng yếu tố lây truyền từ người sang người trong protein PB2 của bệnh cúm A bằng cách phân tích thông tin lẫn nhau trên quy mô lớn. BMC Bioinformatics9 (Phần 1): S18.

19. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. 2009. Sự xuất hiện và đại dịch tiềm năng của vi rút cúm H1N1 có nguồn gốc từ lợn. Bản chất 459: 931–939.http://dx.doi.org/10.1038/nature08157.

20. Kim JH, Hatta M, Watanabe S, Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y. 2010. Vai trò của các axit amin đặc trưng cho vật chủ trong khả năng gây bệnh của cúm gia cầm H5N1 vi rút cúm ở chuột. J Gen Virol 91: 1284 –1289. http://dx.doi.org/10.1099 / vir.0.018143-0.

21. Iwai A, Shiozaki T, Kawai T, Akira S, Kawaoka Y, Takada A, Kida H, Miyazaki T. 2010. Polymerase của vi rút cúm A ức chế interferon loại I cảm ứng bằng cách liên kết với chất kích thích thúc đẩy interferon beta 1. J BiolChem 285: 32064 –32074. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.112458.

22. Rehwinkel J, Tan CP, Goubau D, Schulz O, Pichlmair A, Bier K, Robb N, Vreede F, Barclay W, Fodor E, Reis e Sousa C. 2010. RIG-I phát hiện RNA bộ gen của virus trong quá trình nhiễm virus RNA sợi âm. Ô 140:397– 408. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.020.

23. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. 2011. MAVS tạo thành các tập hợp chức năng giống như prion để kích hoạt và truyền bá thuốc kháng vi-rút đáp ứng miễn dịch bẩm sinh. Ô 146: 448 - 461. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.041.

24. Patel D, Schultz LW, Umland TC. 2013. Tiểu đơn vị polymerase của bệnh cúm A PB2 sở hữu các vị trí liên kết chồng chéo cho tiểu đơn vị polymerase PB1 và protein MAVS của con người. Virus Res 172: 75– 80. http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.003.

25. Yamayoshi S, Watanabe M, Goto H, Kawaoka Y. 2016. Nhận dạng của một protein virus mới được biểu hiện từ phân đoạn PB2 của virus cúm A. J Virol 90: 444 - 456. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02175-15.

26. Fodor E, Crow M, Mingay LJ, Deng T, Sharps J, Fechter P, Brownlee GG.2002. Đột biến một axit amin trong tiểu đơn vị PA của vi rút cúm RNA polymerase ức chế sự phân cắt endonucleolytic của RNA giới hạn. J Virol76: 8989–9001. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.18.8989-9001.2002.

27. Fodor E, Smith M. 2004. Tiểu đơn vị PA là cần thiết cho hạt nhân hiệu quả tích tụ tiểu đơn vị PB1 của RNA polymerase của virus cúm A tổ hợp. J Virol 78: 9144 –9153. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.17.9144-9153.2004.

28. Martell JD, Deerinck TJ, Sancak Y, Poulos TL, Mootha VK, SosinskyGE, Ellisman MH, Ting AY. 2012. Được thiết kế peroxidase ascorbate như một phóng viên được mã hóa di truyền cho kính hiển vi điện tử. Nat Biotechnol 30:1143–1148. http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2375.

29. Boergeling Y, Rozhdestvensky TS, Schmolke M, Resa-Infante P, Robeck T, Randau G, Wolff T, Gabriel G, Brosius J, Ludwig S. 2015. Bằng chứng cho một cơ chế mới của áp suất ngoại vi interferon loại I do vi rút cúm gây ra bởi một protein mã hóa RNA khiếm khuyết. PLoS Pathog 11: e1004924.http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004924.

30. Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, Baudin F, Ruigrok RW, Daigle N, Ellenberg J, Cusack S, Simorre JP, Hart DJ. 2007. Cấu trúc và chức năng nhập khẩu hạt nhân của nhà ga C miền của tiểu đơn vị polymerase PB2 của virus cúm. Nat Struct Mol Biol 14: 229 –233. http://dx.doi.org/10.1038/nsmb1212.

31. Cheung W, Gill M, Esposito A, Kaminski CF, Courousse N, Chwetzoff S, Trugnan G, Keshavan N, Lever A, Desselberger U. 2010. Rotavirus liên kết với các thành phần giọt lipid tế bào để tái tạo trong viroplasms, và các hợp chất phá vỡ hoặc ngăn chặn các giọt lipid ức chế viroplasm hình thành và nhân lên của virus. J Virol 84: 6782– 6798. http://dx.doi.org /10.1128/JVI.01757-09.

32. Cornell RB. 2015. Cảm nhận thành phần lipid màng nhờ chuỗi xoắn ốc lưỡng cực cảm ứng của CCT. Biochim Biophys Acta 1861: 847– 861.http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.022.

33. Hinson ER, Cresswell P. 2009. Protein kháng virus, viperin, bản địa hóa thành các giọt lipid thông qua chuỗi xoắn alpha lưỡng cực đầu N của nó. Proc Natl Acad Khoa học viễn tưởng 106: 20452–20457. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0911679106.

34. Rowe ER, Mimmack ML, Barbosa AD, Haider A, Isaac I, Ouberai MM, Thiam AR, Patel S, Saudek V, Siniossoglou S, Savage DB. 2016. Con phục vụ các xoắn ốc lưỡng cực trung gian nhắm mục tiêu giọt lipid của các perilipin 1–3. J Biol Chem 291: 6664 - 6678. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.691048.

35. Sen A, Sen N, Mackow ER. 2007. Sự hình thành các chuỗi hạt giống tế bào chất bởi protein NSP5 của rotavirus được điều chỉnh và chỉ đạo bởi canxi Miền xoắn đầu C. J Virol 81: 11758 –11767. http://dx.doi.org/10.1128 / JVI.01124-07.

36. von Heijne G. 1986. Trình tự nhắm mục tiêu ty thể có thể tạo thành các vòng xoắn am phiphilic. EMBO J 5: 1335–1342.

37. Perkins GA, Frey TG. 2000. Cái nhìn sâu sắc về cấu trúc gần đây về ty thể thu được bằng kính hiển vi. Micron 31: 97–111. http://dx.doi.org/10.1016/ S0968-4328 (99) 00065-7.

38. Friedman JR, Nunnari J. 2014. Dạng và chức năng của ty thể. Thiên nhiên 505: 335–343. http://dx.doi.org/10.1038/nature12985.

39. Chen W, Bald PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O’Neill R, Schickli J, Palace P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW. 2001. Một loại protein mới trong ty thể của virus cúm A gây cảm ứng tế bào cái chết. Nat Med 7: 1306–1312. http://dx.doi.org/10.1038/nm1201-1306.

40. Yamada H, Chounan R, Higashi Y, Kurihara N, Kido H. 2004. Trình tự nhắm mục tiêu chondrial Mito của protein PB1-F2 của virus cúm A và chức năng của nó trong ti thể. FEBS Lett 578: 331–336. http://dx.doi.org/10.1016 / j.febslet.2004.11.017.

41. Krumbholz A, Philipps A, Oehring H, Schwarzer K, Eitner A, Wutzler P, Zell R. 2011. Kiến thức hiện tại về PB1-F2 của vi rút cúm A. Med Microbiol Immunol 200: 69 –75. http://dx.doi.org/10.1007/s00430-010-0176-8.

42. Kosik I, Holly J, Russ G. 2013. Cuộc thám hiểm PB1-F2 từ toàn bộ protein thông qua miền đến aa hàm dư. Acta Virologic 57: 138 –148.http://dx.doi.org/10.4149/av\_2013\_02\_138.

43. Schulz C, Schendzielorz A, Rehling P. 2015. Mở khóa sơ tuyển con đường nhập khẩu. Xu hướng Biol 25: 265–275. http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.001.

44. York A, Hutchinson EC, Fodor E. 2014. Phân tích tương tác Máy sao chép / sao chép vi rút cúm A xác định protein phosphatase 6 như một yếu tố tế bào cần thiết để sao chép virus hiệu quả. J Virol 88: 13284–13299. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01813-14.

45. Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, Nagata K. 2002. Xác định Hsp90 như một yếu tố vật chủ kích thích liên quan đến bệnh cúm sự tổng hợp RNA của virus. J Biol Chem 277: 45306–45314.1074 / jbc.M206822200.

46. Deng T, Sharps J, Fodor E, Brownlee GG. 2005. Lắp ráp trong ống nghiệm của PB2 với một dimer PB1-PA hỗ trợ một mô hình lắp ráp cúm A mới các tiểu đơn vị polymerase của virus thành một phức hợp trimeric chức năng. J Virol 79:http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.13.8669–8674.2005.

47. Manzoor R, Kuroda K, Yoshida R, Tsuda Y, Fujikura D, Miyamoto H, Kajihara M, Kida H, Takada A. 2014. Protein sốc nhiệt 70 điều chỉnh hoạt động polymerase của virus cúm A. J Biol Chem 289: 7599 –7614. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.507798.

48. Varga ZT, Grant A, Manicassamy B, Palese P. 2012. Virus cúm protein PB1-F2 ức chế sự cảm ứng của interferon loại I bằng cách liên kết với MAVS và giảm điện thế màng ty thể. J Virol 86:8359 - 8366. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01122-12.

49. Chanturiya AN, Basanez G, Schubert U, Henklein P, Yewdell JW, Zim merberg J. 2004. PB1-F2, một protein mito đơn bào được mã hóa bởi virus cúm A, tạo ra các lỗ có kích thước khác nhau trong màng lipid phẳng. J Virol 78: 6304–6312. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.12.6304-6312.2004.

50. Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. 2005. Protein PB1-F2 của vi rút cúm gây chết tế bào thông qua ty thể ANT3 và VDAC1. PLoS Pathog 1: e4. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0010004.

51. Koshiba T, Yasukawa K, Yanagi Y, Kawabata S. 2011. Ti thể điện thế màng là cần thiết cho tín hiệu kháng virus qua trung gian MAVS. Tín hiệu khoa học 4: ra7.

52. Lei Y, Wen H, Yu Y, Taxman DJ, Zhang L, Widman DG, Swanson KV, Wen KW, Damania B, Moore CB, Giguere PM, Siderovski DP, Hiscott J, Razani B, Semenkovich CF, Chen X, Ting JP. 2012. Ti thể protein NLRX1 và TUFM tạo thành một phức hợp điều chỉnh các feron loại I và quá trình tự động. Miễn dịch 36: 933–946. <http://dx.doi.org/10.1016/j>.immuni.2012.03.025.