



PATRYK RENIEWICZ

**Mechanizmy regulacji szlaków  
sygnałowych receptora cytozolowego  
RIG-I przez ligazę ubikwityny Pellino3**

Rozprawa doktorska

*Promotor: dr hab. inż. Jakub Siednienko*

*Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu*

*Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej*

*im. Ludwika Hirsztfelda*

*Polska Akademia Nauk*

WROCLAW 2020

## Spis publikacji oraz wystąpień konferencyjnych

### PUBLIKACJE

"HSV-1/TLR9-Mediated IFN $\beta$  and TNF $\alpha$  Induction Is Mal-Dependent in Macrophages." Zyzak J, Mitkiewicz M, Leszczyńska E, **Reniewicz P**, Moynagh PN, Siednienko J. J Innate Immun. 2019 Dec 18:1-12. DOI: 10.1159/000504542. PMID: 31851971

„Komórkowe receptory egzogenego RNA” Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.: **Reniewicz P.**, Zyzak J., Siednienko J. 2015; 70: 337-348; DOI: 10.5604/17322693.1199987

### WYSTĄPIENIA KONFERENCYJNE

„Pellino3 protein engaged in RIG-I dependent VSV antiviral response.” **Reniewicz P.**, Kula A., Siednienko J., “16th International Conference on Innate Immunity” 07-12.06.2019 Rodos, Grecja

Praca finansowana w ramach projektu **SONATA BIS**

**Narodowego Centrum Nauki** nr UMO-2015/18/E/NZ3/00695



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Pragnę serdecznie podziękować

**Panu dr. hab. Jakubowi Siednienko**

za możliwość realizacji pracy doktorskiej pod swoją opieką oraz liczne wskazówki merytoryczne oraz praktyczne

**Pani dr Małgorzacie Mitkiewicz oraz Pani dr Edycie Makuch**

za liczne wskazówki podczas pisania rozprawy

**Zespołowi Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej oraz Laboratorium Nanobioinżynierii Polskiego Ośrodka Rozwoju Technologii**

za serdeczną atmosferę i pomoc w powstaniu niniejszej pracy

**Rodzicom, bratu, narzeczonej i przyjaciołom**

za wsparcie w chwilach zwątpienia i cierpliwość.

## SPIS TREŚCI

<b>Wykaz skrótów.....</b>	<b>8</b>
<b>1. Streszczenie.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>14</b>
<b>3. WSTĘP .....</b>	<b>16</b>
3.1. Receptory błonowe.....	18
3.1.1. TLR3 .....	19
3.1.2. TLR7/8 .....	20
3.1.3. TLR13 .....	21
3.2. Receptory cytozolowe .....	22
3.2.1. PKR .....	22
3.2.2. RLR .....	23
3.2.2.1. RIG-I .....	25
3.2.2.2. MDA5.....	26
3.2.2.3. LGP2 .....	27
3.2.2.4. Szlak sygnałowy aktywowany przez RLR.....	27
3.3. Rodzina białek Pellino .....	29
3.3.1. Funkcje, budowa i modyfikacje białek Pellino .....	29
3.3.2. Pellino1.....	32
3.3.3. Pellino2.....	33
3.3.4. Pellino3.....	34
<b>4. Cel pracy.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Materiały i metody.....</b>	<b>38</b>
5.1. Materiały .....	38

5.1.1. Odczynniki chemiczne i reagenty .....	38
5.1.2. Zestawy gotowe.....	39
5.1.3. Sekwencje oligonukleotydowe.....	40
5.1.4. Przeciwciała .....	41
5.1.5. Bufory i żele .....	42
5.1.6. Aparatura, akcesoria i programy komputerowe .....	43
5.2. Metody .....	44
5.2.1. Hodowle komórkowe .....	44
5.2.2. Hodowla bakteryjna .....	45
5.2.3. Namnażanie wirusów .....	46
5.2.4. Oznaczanie miana wirusów .....	46
5.2.5. Analiza ekspresji genów.....	47
5.2.5.1. Izolacja całkowitego RNA .....	47
5.2.5.2. Degradacja genomowego DNA .....	48
5.2.5.3. Odwrotna transkrypcja (RT-PCR) .....	48
5.2.5.4. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR).....	48
5.2.5.5. Reakcja PCR .....	49
5.2.6. Oznaczanie poziomu biologicznie aktywnych interferonów typu I (Bioassay)....	49
5.2.7. Oznaczenie poziomu cytokin (IP-10 oraz TNF $\alpha$ ) .....	50
5.2.8. Oznaczenie poziomu aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF .....	50
5.2.9. Oznaczanie ilości białka metodą Bradforda.....	51
5.2.10. SDS-PAGE i Western blot .....	51
5.2.10.1. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym .....	51
5.2.10.2. Elektrotransfer białek .....	52
5.2.10.3. Detekcja białek immobilizowanych na membranie nitrocelulozowej .....	52
5.2.12. Analiza statystyczna.....	52
<b>6. Wyniki.....</b>	<b>53</b>

6.1. Badanie indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej w komórkach BMDM .....	53
6.1.1. Analiza ekspresji genu <i>Ifnβ</i> po stymulacji wybranymi wirusami .....	53
6.1.2. Analiza poziomu produkcji białek efektorowych przez komórki BMDM .....	54
6.1.3. Analiza ekspresji genu <i>Peli3</i> po stymulacji wirusem VSIV .....	55
6.2. Rola receptorów z rodziny RLR w odpowiedzi przeciwwirusowej indukowanej po infekcji VSIV .....	56
6.2.1. Analiza ekspresji genów efektorowych w komórkach BMDM <i>Mavs<sup>-/-</sup></i> po stymulacji wirusem VSIV .....	56
6.2.2. Analiza aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF w komórkach A549 po stymulacji wirusem VSIV .....	57
6.3. Rola białka Pellino3 w szlaku sygnałowym zależnym od receptorów z rodziny RLR. 59	
6.3.1. Analiza ekspresji genów efektorowych w komórkach BMDM <i>Peli3<sup>-/-</sup></i> po stymulacji wirusem VSIV .....	59
6.3.2. Badanie fenotypu linii komórkowej BMDM typu dzikiego i <i>Peli3<sup>-/-</sup></i> .....	61
6.4. Badanie roli białka Pellino3 w aktywacji wybranych czynników transkrypcyjnych w komórkach BMDM po infekcji VSIV .....	62
6.5. Badanie roli białka Pellino3 w aktywacji wybranych MAP kinaz w komórkach BMDM po infekcji VSIV .....	63
6.6. Badanie wpływu kinaz białkowych ERK1/2 na ekspresję genów <i>Ifnβ</i> , <i>Cxcl10</i> oraz <i>Tnfa</i> w komórkach BMDM po infekcji VSIV .....	65
6.6.1. Analiza poziomu transkrypcji genów efektorowych w komórkach BMDM po stymulacji wirusem VSIV w obecności inhibitora kinaz ERK1/2 - FR180204.....	65
6.6.2. Analiza poziomu produkcji interferonu typu I, IP-10 oraz TNFα przez BMDM po stymulacji wirusem VSIV w obecności FR180204 .....	66
6.7. Badanie aktywacji kinaz p70S6 oraz p90RSK w komórkach BMDM po infekcji VSIV.....	67
6.8. Badanie czynników inicjacji translacji eIF4A, eIF4B oraz eIF4E w komórkach BMDM po infekcji VSIV .....	69
<b>7. Podsumowanie wyników .....</b>	<b>71</b>

<b>8. Dyskusja.....</b>	<b>72</b>
<b>9. Wnioski .....</b>	<b>79</b>
<b>10. Spis Rycin i rysunków .....</b>	<b>80</b>
10.1. Ryciny .....	80
10.2. Rysunki.....	80
<b>11. Literatura .....</b>	<b>82</b>

## Wykaz skrótów

AIM2	(ang. absent in melanoma 2) białko nieobecne w czerniaku 2
AP-1	(ang. activator protein 1) czynnik transkrypcyjny
ATP	adenozyno-5'trifosforan
BCL10	(ang. B-cell lymphoma/leukemia 10) białko 10 obecne w białaczce
BMDM	(ang. bone-marrow-derived macrophage) unieśmiertelnione mysie makrofagi pochodzenia szpikowego
C16	inhibitor PKR (6,8-dihydro-8-(1H-imidazol-5-yl-methylene)-7H-pyrrolo[2,3-g]benzothiazol-7-one)
CARD	(ang. caspase activation and recruitment domain) domena aktywacji i rekrutacji kaspazy
CCL20	chemokina 20
cGAMP	(ang. cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate) cykliczny guanozynomonofosforan-adenozynomonofosforan
cGAS	(ang. cGAMP synthase) syntaza cGAMP
c-JUN	czynnik transkrypcyjny
CpG	hipometylowane motywy
CREB	(ang. cyclic AMP-responsive element-binding protein 1) białko wiążące element odpowiedzi na cAMP
CTD	(ang. C-terminal domain) domena C – końcowa
CXCL8	interleukina 8
DAMP	(ang. damage-associated molecular patterns) wzorce molekularne związane z zagrożeniem/uszkodzeniem
DISK	(ang. death-inducing signaling complex) kompleks sygnalizacyjny indukujący śmierć
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
dsRNA	dwuniciowy kwas rybonukleinowy
EAE	(ang. experimental autoimmune encephalomyelitis) eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu
eIF2 $\alpha$	(ang. alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2) podjednostka $\alpha$ eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2
eIF4	(ang. eukaryotic initiation factor 4) eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4
ELK	(ang. ETS domain-containing protein) białko zawierające domenę ETS
EMCV	(ang. encephalomyocarditis virus) wirus zapalenia mózgu i mięśnia sercowego
ERK 1/2	(ang. mitogen-activated protein kinase 1 and 2) kinazy białkowe regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi



FADD	(ang. FAS-associated death domain protein) białko z domeną DEATH związane z FAS
FAS	(ang. tumor necrosis factor receptor superfamily member 6) białko 6 z super rodziny receptorów czynnika $\alpha$ martwicy nowotworu
FHA	(ang. forkhead-associated domain) domena odpowiedzialna za interakcje między białkami
FR180204	inhibitor kinaz białkowych ERK1/2
HEK 293	(ang. human embryonic kidney 293) ludzkie komórki zarodkowe nerki
HEL	domena helikazy
HFV	(ang. human foamy virus) ludzki wirus pianisty
HIV	(ang. human immunodeficiency viruses) ludzki wirus niedoboru odporności
HMGB	(ang. high mobility group box 1 protein) niehistonowe białko chromosomalne
HPeV	(ang. human parechovirus) wirus brodawczaka ludzkiego
HPIV	(ang. human parainfluenza viruses) ludzki wirus paragrypy
HRSV	(ang. human respiratory syncytial virus) ludzki syncytialny wirus oddechowy
HSP	(ang. heat shock protein) białko szoku cieplnego
IFN	interferon
IKK	(ang. inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase) kinaza fosforylująca podjednostkę inhibitorową NF- $\kappa$ B
IL	interleukina
IL-R	receptor interleukiny
IP-10/CXCL10	(ang. C-X-C motif chemokine 10) białko 10 indukowane interferonem $\gamma$
IRAK	(ang. interleukin-1 receptor-associated kinase) kinaza związana z receptorem dla IL-1
IRF	(ang. interferon regulatory factor) czynnik regulujący interferon
ISG	(ang. interferon stimulated genes) geny stymulowane interferonem
ISRE	(ang. interferon-sensitive response element) element odpowiedzi stymulowany interferonem
itSa	termicznie inaktywowany <i>Staphylococcus aureus</i>
I $\kappa$ B $\alpha$	(ang. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) podjednostka inhibitorowa czynnika NF- $\kappa$ B
JNK	(ang. c-Jun N-terminal kinase 1) N-końcowa kinaza czynnika transkrypcyjnego c-Jun
JSH-23	inhibitor translokacji jądrowej czynnika NF- $\kappa$ B
kDa	kilodalton, jednostka masy atomowej

LGP2	(ang. laboratory of genetics and physiology 2) pracownia genetyki i fizjologii 2; receptor z rodziny RLR
LPS	lipopolisacharyd
LRR	(ang. leucine-rich repeat) domena bogata w powtórzenia leucyny
MAP	(ang. mitogen-activated protein) białka aktywowane mitogenami
MAVS	(ang. mitochondrial antiviral-signaling protein) mitochondrialne białko przeciwwirusowego szlaku sygnałowego
MCMV	(ang. murine cytomegalovirus) myszy cytomegalowirus
MDA5	(ang. melanoma differentiation-associated protein 5) białko 5 związane z różnicowaniem czerniaka
MDP	(ang. muramyl dipeptide) dipeptyd muramylowy
MEF	(ang. mouse embryonic fibroblasts) mysie embrionalne fibroblasty
MEKK1	(ang. mitogen-activated protein kinase 1) kinaza kinazy białkowej aktywowana mitogenem 1
MKK6	(ang. dual specificity mitogen-activated protein kinase 6) podwójnie specyficzna, aktywowana mitogenem kinaza kinazy białkowej 6
MOI	(ang. multiplicity of infection) wielokrotność infekcji
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy
mTOR	(ang. mammalian target of rapamycin kinase) kinaza białkowa
MyD88	(ang. myeloid differentiation primary response 88) białko adaptorowe receptorów TLR
NEMO	(ang. NF-kappa-B essential modulator) niezbędny modulator NF-κB
NF-κB	(ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) czynnik jądrowy κB
NIK	(ang. mitogen-activated protein kinase 14) kinaza kinazy białkowej aktywowana mitogenem 14
NLR	(ang. NOD like receptor) receptory NOD – podobne
NOD	(ang. nucleotide-binding oligomerization domain containing) białko zawierające domenę wiązania i oligomeryzacji nukleotydów
oxLDL	(ang. oxidized low-density lipoprotein) oksydowane lipoproteiny o niskiej gęstości
p38	kinaza białkowa p38 aktywowana mitogenem
RSK	(ang. ribosomal s6 kinase) kinazy rybosomalne s6
Pam <sub>2</sub> CSK <sub>4</sub>	agonista TLR2
PAMP	(ang. pathogen-associated molecular patterns) wzorce molekularne związane z patogenami
pDC	(ang. plasmacytoid dendritic cells) plazmocytoidalne komórki dendrytyczne
PFU	(ang. plaque forming unit) jednostka tworząca łyśkę

PKR	(ang. protein kinase R) kinaza białkowa R
poly(dT)	homopolimer tymidyny
poly(I:C)	kwask poliinozynowo-policytydylowy
pz	para zasad
R848	selektywny agonista receptorów TLR7/8
RANTES/CCL5	(ang. regulated on activation normal T-cell Expressed and Secreted) chemokina 5
RIG-I	(ang. retinoic acid-inducible gene I) gen indukowany kwasem retinowym
RING	(ang. really interesting new gene) domena katalityczna ligazy ubikwityny
RIP	(ang. receptor-interacting protein kinases) kinaza białkowa oddziałująca z receptorem
RLR	(ang. RIG-I-like receptor) receptory RIG-I – podobne
RNA	kwask rybonukleinowy
rRNA	rybosomalny kwask rybonukleinowy
SOCS	(ang. Suppressor of cytokine signaling) czynnik hamujący przekazanie sygnału zależnego od cytokin
STING	(ang. stimulator of interferon genes) białko stymulujące geny interferonu
TAK1	(ang. mitogen-activated protein kinase 7) kinaza 1 związana z TGF $\beta$
TANK	(ang. TRAF family member-associated NF-kappa-B activat) aktywator NF- $\kappa$ B związany z rodziną TRAF
TBK1	(ang. TANK-binding kinase 1) kinaza 1 wiążąca TANK
TCR	(ang. T-cell receptor) receptor limfocyty T
TGF	(ang. transforming growth factor) transformujący czynnik wzrostu
THP-1	linia ludzkich monocytów krwi obwodowej
TIR	(ang. toll-interleukin 1 receptor) domena homologii receptora TLR/receptora dla IL-1
TLR	(ang. toll like receptor) receptor Toll – podobny
TNF $\alpha$	(ang. tumor necrosis factor $\alpha$ ) czynnik $\alpha$ martwicy nowotworu
TNFR	(ang. TNF receptor) receptor czynnika $\alpha$ martwicy nowotworu
TRADD	(ang. tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein) związane z TNFR1 białko adaptorowe z domeną śmierci
TRAF	(ang. TNF receptor-associated factor) czynnik związany z receptorem TNF
TRIF	(ang. TIR-domain-containing adapter-inducing interferon $\beta$ ) białko adaptorowe posiadające domenę TIR, indukujące interferon $\beta$
TRIM25	(ang. tripartite motif-containing protein 25) białko 25 zawierające motyw potrójny
UBA	(ang. ubiquitin-associated domain) domena związana z ubikwityną
VSIV	(ang. vesicular stomatitis Indiana virus) wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej szczepu Indiana

# 1. Streszczenie

Receptory z rodziny RLR (ang. RIG-I-like receptor) są bardzo ważnym elementem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej odpowiedzialnym za rozpoznanie infekcji wirusowej w komórce. W obrębie tej grupy jedynymi członkami rodziny zdolnymi do inicjacji przeciwwirusowej kaskady sygnałowej są: RIG-I (ang. retinoic acid-inducible gene I) i MDA5 (ang. melanoma differentiation-associated protein 5). Niniejsza praca koncentruje się na badaniach mechanizmu regulacji RIG-I odpowiedzialnego za rozpoznawanie dwuniciowego RNA obecnego w cytoplazmie podczas infekcji wirusowej. W następstwie związania przez RIG-I wirusowego RNA sygnał przekazywany jest na białko adaptorowe MAVS (ang. mitochondrial antiviral-signaling protein), co inicjuje kaskady sygnałowe skutkujące aktywacją czynników transkrypcyjnych IRF3/7 (ang. interferon regulatory factor) oraz NF- $\kappa$ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Wynikiem tego jest rozpoczęcie produkcji interferonu typu I oraz innych cytokin, takich jak IP-10 (ang. C-X-C motif chemokine 10) lub TNF $\alpha$  (ang. tumor necrosis factor).

Celem pracy było zbadanie wpływu białka Pellino3 na regulację szlaku sygnałowego inicjowanego przez receptor RIG-I. Pellino3 jest ligazą ubikwityny, która zaangażowana jest w regulację wielu szlaków sygnałowych wrodzonej odpowiedzi immunologicznej m.in. zależnej od TLR3, TLR2 (ang. toll like receptor), czy TNFR.

W pierwszym etapie pracy ustalono, że wirusem, który najefektywniej pobudza zależną od RLR produkcję interferonu typu I w komórkach BMDM (ang. bone-marrow-derived macrophage) jest VSIV (ang. vesicular stomatitis Indiana virus). W kolejnych eksperymentach potwierdzono główną rolę RIG-I w badanym szlaku sygnałowym. Następnie pokazano, że białko Pellino3 bierze udział w regulacji kaskady sygnałowej aktywowanej przez VSIV/RIG-I. Wykazano, że Pellino3 negatywnie reguluje ścieżkę aktywacji czynników transkrypcyjnych IRF3/7 oraz nie wpływa na szlak NF- $\kappa$ B. Wykazano również, że brak białka Pellino3 w komórkach nie wpływa na poziom ekspresji receptorów RIG-I i MDA5 oraz białka adaptorowego MAVS.

Dalsze badania pokazały, że brak białka Pellino3 skutkuje brakiem produkcji biologicznie aktywnego interferonu typu I oraz cytokin prozapalnych. Dodatkowo zaobserwowano, że w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> po infekcji VSIV nie dochodzi do aktywacji kinaz ERK1/2 (ang. mitogen-activated protein kinase 1 and 2), jak ma to miejsce w komórkach typu dzikiego. Wpływ kinaz ERK1/2 na indukowaną wirusem produkcję

cytokin potwierdzono również przy wykorzystaniu farmakologicznego inhibitora tych kinaz – FR180204. Poszukiwanie rozwiązań problemu rozbieżności między zależną od Pellino3 aktywacją transkrypcji genów *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa*, a brakiem wydzielania tych cytokin doprowadziło do rozpoczęcia badań nad czynnikami inicjacji translacji. Wykazano, że zaburzenie fosforylacji ERK1/2 skutkuje brakiem aktywacji kinazy p90RSK (ang. ribosomal s6 kinase). Dodatkowo pokazano, że zaburzenie ścieżki sygnałowej ERK1/2-p90RSK skutkuje brakiem aktywacji czynników inicjacji translacji eIF4B oraz eIF4E (eIF4 ang. eukaryotic initiation factor 4).

Przedstawione w pracy doktorskiej wyniki pozwoliły na sformułowanie hipotezy, w której ligaza Pellino3 pełni rolę przełącznika molekularnego między transkrypcją, a translacją w procesie odpowiedzi przeciwwirusowej inicjowanej przez VISV w makrofagach.

## 2. Abstract

Receptors from the RLR family are a very important node of the innate immune response and are responsible for recognizing viral infection in the organism's cells. RIG-I and MDA5 are the only members of the RLR family that are able to initiate an antiviral signaling cascade. The main receptor on which this work focuses is RIG-I, which is responsible for recognizing double-stranded RNA present in the cytoplasm during infection with most viruses. As a result of RIG-I recognition of viral RNA, the signal is transmitted to the MAVS adapter protein. The signaling cascade then follows two pathways resulting in the activation of IRF3/7 and NF- $\kappa$ B transcription factors. This results in production of type I interferon and other cytokines such as IP-10 or TNF $\alpha$ .

The aim of the study was to determine the effect of Pellino3 protein on the regulation of the signaling pathway initiated by the RIG-I receptor. Pellino3 is a ubiquitin ligase which is involved in the regulation of many signaling pathways of innate immune responses including among others one activated by TLR3.

In the first stage of this work, it was established that the virus that most effectively stimulates the production of interferon in BMDM cells is VSIV. Then it was proved that in BMDM cells VSIV is recognized by receptors from the RLR family. The involvement of RLR receptors in the recognition of VSIV virus was then narrowed to the RIG-I receptor.

In the next stage, it was proved that the Pellino3 protein is involved in the regulation of the RIG-I activated cascade. Pellino3 has been shown to negatively regulate the activation path of IRF3/7 transcription factors and does not affect the NF- $\kappa$ B pathway. It has also been proven that the lack of Pellino3 protein in cells does not affect the expression level of RIG-I and MDA5 receptors and of the MAVS adaptor protein.

Further studies have shown that the lack of Pellino3 protein results in a lack of production of biologically active type I interferon and proinflammatory cytokines. In addition, it has been proven that in BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> cells, after VSIV infection, ERK1/2 kinases are not activated which activation is visible in wild-type cells. Deficiencies in cytokine production have also been associated with the lack of activation of one of the MAP (ang. mitogen-activated protein) kinases ERK1/2 by the use of the FR180204 inhibitor.

Searching for possible solutions to the problem of discrepancies between Pellino3 activation of transcription of *Ifn $\beta$* , *Cxcl10* and *Tnfa* genes and the lack of production of these cytokines in the form of proteins was found on the ERK1/2-p90RSK signaling pathway which leads to activation of translation initiation factors. This led to the investigation of the level of p90RSK kinase activation. ERK1/2 phosphorylation disorder has been shown to result in a lack of p90RSK kinase activation. In addition, it has also been shown that the disruption of the ERK1/2-p90RSK signaling pathway results in the lack of activation of eIF4B and eIF4E translation initiation factors. The effect of the Pellino3 protein on the antiviral response was also confirmed in a mouse model. The results presented in the doctoral dissertation were used to propose a model in which the Pellino3 protein acts as a molecular switch between transcription and translation in the antiviral response initiated by the RIG-I receptor in BMDM cells.

### 3. WSTĘP

Organizmy wielokomórkowe są narażone na ciągły kontakt z różnego rodzaju czynnikami wpływającymi na zaburzenie homeostazy. Wśród nich szczególną grupę stanowią mikroorganizmy patogenne, dzięki którym w toku ewolucji doszło do wykształcenia licznych systemów odporności nieswoistej, zdolnych do wykrywania specyficznych cząsteczek informujących o zagrożeniu. Ogólnie cząsteczki te zwane są wzorcami molekularnymi związanymi z zagrożeniem (DAMP, ang. danger-associated molecular patterns). Ich zadaniem jest uruchomienie kaskad sygnałowych pobudzających organizm do odpowiedzi na zagrożenie. Odrębną nazwę, choć pełniące to samo zadanie, noszą wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP, ang. pathogen-associated molecular patterns), pojawiające się w organizmie wraz z atakiem mikroorganizmów.

Do DAMP zaliczane są endogenne cząsteczki, które powstały lub zmieniły swoją lokalizację w wyniku uszkodzenia komórki lub tkanki. Grupa ta obejmuje: białka związane ze stresem komórkowym, takie jak białka szoku cieplnego (HSP, ang. heat shock protein), białko HMGB1 (ang. high-mobility group box 1 protein), związki pochodzące z macierzy zewnątrzkomórkowej, m.in. fibronektyna i kwas hialuronowy oraz endogenne kwasy nukleinowe, które znalazły się w niedozwolonych dla siebie przedziałach komórkowych (1, 2).

Wzorce PAMP obejmują cząsteczki pochodzenia egzogenne i zalicza się do nich m.in. białka kapsydów wirusowych, niektóre białka bakteryjne (np. flagelina) oraz elementy osłon bakterii (lipopolisacharydy czy peptydoglikany). Do PAMP zalicza się również egzogenne cząsteczki kwasów nukleinowych, które są zmodyfikowane w sposób niewystępujący u organizmów wyższych (1, 3).

Podczas inwazji drobnoustrojów patogennych na organizm dochodzi do pojawienia się w jego obrębie obcego materiału genetycznego. Może on zostać wprowadzony do komórki gospodarza przez wirusy, które powielają własny genom za pomocą maszynarii molekularnej zakażonych komórek lub pojawia się on w następstwie fagocytozy mikroorganizmów.

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) występuje w komórkach eukariotycznych jedynie w jądrze komórkowym i mitochondriach. Każdorazowe wykrycie DNA w cytoplazmie lub endosomach traktowane jest jako sygnał świadczący o uszkodzeniu



lub inwazji patogenu i skutkuje natychmiastowym uruchomieniem kaskad sygnałowych wrodzonego układu odpornościowego (4). Istnieje szereg receptorów, które są odpowiedzialne za wykrycie cząsteczek DNA. Jednym z nich jest białko AIM2 (ang. absent in melanoma 2) rozpoznające pojawiający się w cytoplazmie dsDNA. Aktywacja tego receptora prowadzi do uformowania kompleksów inflamasomów aktywujących ścieżki pyroptozy, czyli programowanej śmierci komórki (5). Innym przykładem białka zdolnego do wykrycia obecności niepożądanego DNA w cytozolu jest cGAS (ang. cGAMP synthase). Białko to po związaniu DNA syntetyzuje cykliczny guanozynomonofosforan-adenozynomonofosforan, który jest aktywatorem białka STING (ang. stimulator of interferon genes) i produkcji interferonu typu I (6). Przykładem receptora błonowego rozpoznającego endogenne DNA pochodzenia bakteryjnego, który dostaje się do komórki na drodze endosomalnej jest TLR9. Związanie liganda przez ten receptor powoduje aktywację wielu szlaków sygnałowych i uruchamia produkcję interferonu typu I oraz cytokin prozapalnych (7)

Kwasem nukleinowym, który można zaliczyć do PAMP jest również egzogenne RNA. Cząsteczka ta jest dużo bardziej rozpowszechniona w przyrodzie niż DNA i może być wykorzystywana nie tylko jako matryca pośrednicząca w przepisaniu genu na białko, ale także jako nośnik informacji genetycznej wielu rodzajów wirusów w postaci zarówno jednonicowego, jak i dwunonicowego RNA. Rozpoznanie tej cząsteczki przez układ odpornościowy jest dużo bardziej skomplikowane niż w przypadku DNA. Jest to spowodowane obecnością w cytoplazmie komórek organizmów wyższych różnego rodzaju endogennego RNA. Z tego powodu RNA w komórce podlega ściślejszej kontroli przez specjalne modyfikacje lub towarzyszące mu białka opiekuńcze (czaperony). Do najpowszechniej występujących modyfikacji zalicza się metylację oraz dodanie czapeczki na 5' końcu RNA. Takie modyfikacje uniemożliwiają receptorom komórkowym rozpoznawanie własnego RNA jako liganda. Czaperony z kolei oprócz swojej podstawowej funkcji ochrony RNA przed degradacją, ukrywają je przed receptorami układu odpornościowego. Dodatkowym sposobem na ochronę endogennego RNA jest przyjmowanie przez nie skomplikowanych struktur trzeciorzędowych, tak jak w przypadku tRNA czy rRNA. Konformacje te uniemożliwiają fizycznie dopasowanie owego RNA do kieszeni rozpoznających ligand w receptorze.

Ze względu na lokalizację komórkową, receptory zdolne do rozpoznawania obcego RNA można podzielić na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowią receptory, które związane są z błoną komórkową, a ściślej z błonami endosomów. Do tej grupy należy część

receptorów Toll – podobnych (TLR, ang. toll-like receptors): TLR3, odpowiedzialny za rozpoznawanie dwuniciowego RNA; TLR7/8, rozpoznający jednoniciowe RNA oraz TLR13, który rozpoznaje sekwencje CGGAAAGACC pochodzące z podjednostki 23S RNA rybosomu bakteryjnego (8–10). Drugą grupę receptorów rozpoznających egzogeny dsRNA stanowią receptory cytoplazmatyczne. Grupa ta składa się z kinazy białkowej zależnej od RNA (PKR, ang. protein kinase R) oraz receptorów RIG-I podobnych (RLR, ang. RIG-I like receptors). Do RLR należą z kolei trzy białka: LGP2 (ang. laboratory of genetics and physiology 2), które nie jest w pełni funkcjonalnym receptorem, ponieważ pozbawione jest domeny umożliwiającej przekazanie sygnału, MDA5 (ang. melanoma differentiation associated protein 5) oraz RIG-I (ang. retinoic acid inducible gene I), które zdolne są do uruchomienia szlaku sygnałowego po rozpoznaniu liganda (11–13).

### 3.1. Receptory błonowe

Wszystkie receptory z rodziny TLR mają podobny plan budowy i składają się z trzech domen. Pierwszą domeną jest LRR (ang. leucine rich repeat), która może być zlokalizowana od strony zewnątrzkomórkowej lub w przypadku receptorów TLR umiejscowionych w błonie endosomalnej, skierowana do wnętrza endosomu. Domena LRR znajduje się na *N* – końcu białek z rodziny TLR i odpowiedzialna jest za wiązanie liganda. Różnice w budowie tej części receptora wpływają na to jaki rodzaj cząsteczki będzie on rozpoznawał. Drugą domenę TLR stanowi krótka, przezbłonowa  $\alpha$ -helisa, która odpowiada za kotwiczenie białek w błonie komórkowej. Ostatnią domeną występującą we wszystkich receptorach rodziny TLR jest umiejscowiona na *C* – końcu domena TIR (ang. toll-interleukin 1 receptor). Odpowiada ona za przekazanie sygnału od receptora na białko adaptorowe. Dla większości receptorów TLR białkiem adaptorowym jest białko MyD88 (ang. myeloid differentiation primary response 88). Wyjątek stanowią receptory: TLR3, który wykorzystuje białko TRIF (ang. TIR-domain- containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) oraz TLR4, który wykorzystuje oba białka (14).

### 3.1.1. TLR3

TLR3, wiążący dwuniciowy RNA (dsRNA), odpowiedzialny jest przede wszystkim za rozpoznawanie genomu wirusowego, który dostaje się do wnętrza endosomu najczęściej na skutek endocytozy lub fagocytozy. W badaniach naukowych jako ligand dla tego receptora wykorzystuje się syntetyczny poly(I:C) (ang. polyinosinic: polycytidylic acid). TLR3 jest ściśle zaangażowany w odpowiedź przeciwwirusową (8, 15) i w większości typów komórek jest on umiejscowiony w błonie endosomów. Wskazują na to prace, w których zarówno komórki układu odpornościowego, takie jak komórki dendrytyczne, limfocyty B czy makrofagi, jak i komórki pierwotne np. MEF (ang. mouse embryonic fibroblasts) odpowiadają na stymulację poly(I:C) dopiero w obecności czynnika transfekującego (16). Wyjątkowym przykładem są komórki nabłonka płuc, które wykazują obecność TLR3 zarówno na powierzchni, jak i w endosomach. Może to świadczyć o dodatkowym przystosowaniu ewolucyjnym organizmu, spowodowanym koniecznością wykształcenia szybkiej reakcji na obecność wirusów przenoszonych drogą kropelkową (17).

Jak wcześniej wspomniano, ligandem dla TLR3 jest dsRNA. Eksperymentalnie wykazano, że TLR3 jest zdolny do wiązania fragmentów o długości od 45 pz (par zasad), jednakże cząsteczki dłuższe niż 90 pz znacznie mocniej wpływają na pobudzenia układu odpornościowego (18). Funkcjonalną formę receptora TLR3 stanowi homodimer (19), który w niskim pH endosomu eksponuje dodatnio naładowane histydyny. Taka konformacja TLR3 umożliwia wiązanie ujemnie naładowanych cząsteczek dsRNA. Zmiany w strukturze przestrzennej receptora zachodzące po związaniu dsRNA skutkują dimeryzacją domen TIR oraz rekrutowaniem do kompleksu białka adaptorowego TRIF i powodują uruchomienie dwóch głównych kaskad sygnałowych (20, 21). W pierwszym szlaku białko adaptorowe TRIF rekrutuje białko TRAF3 (ang. TNF receptor-associated factor), które jest zdolne do aktywacji kolejnych białek w szlaku, czyli kinaz: TBK oraz IKK $\epsilon$  (ang. inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase). Skutkuje to aktywacją czynnika transkrypcyjnego IRF3, który uruchamia produkcję IFN typu I (17, 22, 23). Drugi, możliwy do aktywacji przez TLR3, szlak sygnałowy wymaga rekrutacji przez białko TRIF kompleksu RIP1-TRAF6 (RIP, ang. receptor-interacting protein kinases). Białka te są zdolne do aktywacji NF- $\kappa$ B oraz AP-1 (ang. activator protein 1) – czynników transkrypcyjnych indukujących produkcję cytokin prozapalnych, takich jak: RANTES

(ang. regulated on activation normal T-cell Expressed and Secreted), IP-10, TNF $\alpha$  czy IL-6 (8, 24).

### 3.1.2. TLR7/8

W warunkach fizjologicznych TLR7/8 odpowiedzialne są za rozpoznawanie jednoniciowego RNA (ssRNA), wirusowego materiału genetycznego, który podczas infekcji wirusowej trafia do endosomu (25). W badaniach *in vitro* na liniach komórkowych do stymulacji TLR7/8 najczęściej używa się imidazochinoliny (R848) oraz rzadziej tiazochinoliny czy analogów zasad, takich jak loksorybidy, bromopiryminy lub poly(dT) (26–28). TLR7 nie ulega ekspresji we wszystkich typach komórek. Jego najwyższy poziom obserwuje się w plazmacytoidalnych komórkach dendrytycznych (pDC, ang. plasmacytoid dendritic cells) oraz w makrofagach. Nieco niższy poziom obserwuje się natomiast w limfocytach B i monocytach. TLR8 obecny jest w komórkach ludzkich np. w monocytach (9, 29). W komórkach mysich TLR8 kodowany jest przez homologiczny do ludzkiego gen. Dodatkowo jego funkcjonalność potwierdzona została w badaniach *in vitro* w komórkach HEK293 (ang. human embryonic kidney 293), gdzie wykazano, że w nadekspresji jest on w stanie aktywować ścieżkę NF- $\kappa$ B (30, 31).

Badacze dowiedli, że ssRNA bogate w urydynę, która znacznie częściej występuje w genomie wirusowym, wyraźnie mocniej aktywuje TLR7/8. Wykazano ponadto, że nie tylko różnice w samej sekwencji, ale także w strukturze drugorzędowej znacząco wpływają na immunogenność cząsteczki ssRNA. Różnice te sprawiają, że określenie, który ssRNA będzie zdolny do pobudzenia receptora, a który będzie traktowany jako endogenny jest niemal niemożliwe (9, 25, 32). Innym bardzo efektywnym sposobem na ukrycie endogennego ssRNA przed TLR7/8 jest modyfikacja nukleotydów. Wykazano, że duża ilość metylowanych zasad w sekwencji RNA uniemożliwia rozpoznanie oraz obniża zdolność wiązania RNA przez receptor. Zależność tę potwierdzono również wykorzystując syntetycznie modyfikowane RNA (32).

TLR7/8 mają największe znaczenie w przypadku zakażenia wirusami, których materiał genetyczny złożony jest z jednoniciowego RNA, jednakże zdolne są też do rozpoznania wirusów dsRNA, które podczas infekcji wykorzystują ssRNA w procesie powielania swojego genomu. Do wirusów rozpoznawanych przez TLR7/8 należą między innymi HIV-1 (ang. human immunodeficiency viruses), HFV (ang. human foamy virus),

HPeV (ang. human parechovirus) oraz MCMV (ang. murine cytomegalovirus) (33–36). Wykazano również, że receptory TLR7/8 zdolne są do rozpoznania bakteryjnego RNA. Monocyty, które infekowane były bakteriami *Helicobacter pylori* i *Borelia burgdorferi* produkowały interferon  $\beta$ . Badacze wykazali ponadto związek między polimorfizmem w genie kodującym TLR8, a wrażliwością na *Mycobacterium bovis* (9, 37). Pokazano również, że poziom cytokin, takich jak: IFN typu I i III oraz IL-12 produkowanych podczas zakażenia *Plasmodium chabaudi* oraz *Plasmodium falciparum* zależy od pobudzenia TLR7 (38).

Najnowsze badania struktury krystalograficznej TLR7 wskazują, że receptor ten tworzy homodimer i w tej formie jest funkcjonalny. Wykazano, że wbrew temu co poprzednio sądzono, TLR7 nie podlega cięciu proteolitycznemu w celu jego aktywacji. Potwierdzono ponadto zdolność wiązania ssRNA bogatego w urydinę oraz scharakteryzowano nowe miejsce wiązania liganda, którym jest cząsteczka guanozyny (39, 40).

TLR7/8 jako białko adaptorowe wykorzystują MyD88, który jest zdolny do aktywacji dwóch równoległych szlaków sygnałowych. Pierwszy z nich prowadzi do aktywacji NF- $\kappa$ B i produkcji cytokin prozapalnych. W szlaku tym biorą udział rekrutowane przez MyD88 białka: IRAK4 i 2 (ang. interleukin-1 receptor-associated kinase) oraz TRAF6. Następnie sygnał przenoszony jest za pośrednictwem kinazy TAK1 (ang. mitogen-activated protein kinase 7) na kompleks kinaz złożony z NEMO/IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  (NEMO ang. NF-kappa-B essential modulator), który ostatecznie aktywuje czynniki transkrypcyjne. Druga ścieżka angażuje białka IRAK4 i 1 oraz TRAF6, które aktywują kinazę IKK $\alpha$  i w konsekwencji prowadzą do tworzenia homodimeru IRF7 oraz indukcji interferonu typu I (9, 25, 35, 41, 42).

### 3.1.3. TLR13

Ostatnim receptorem grupy receptorów błonowych rozpoznających RNA jest TLR13. Został on scharakteryzowany stosunkowo niedawno i jest najmniej poznany receptorem TLR. Wiadomo, że związany jest on z błoną endosomalną. Wykryto go między innymi w konwencjonalnych komórkach dendrytycznych wyizolowanych z mysiej śledziony. Udowodniono również, że komórki ekspresjonujące TLR13 zdolne są do produkcji cytokin po stymulacji termicznie inaktywowanym *Staphylococcus aureus*

(itSa), a preinkubacja itSa z rybonukleazą A prowadzi do całkowitego zaniku odpowiedzi. W dalszych badaniach wykazano, że ligandem dla TLR13 jest konkretna sekwencja w bakteryjnym, rybosomalnym RNA – CGGAAAGACC (10). Warto zauważyć również, że sekwencja rozpoznawana przez TLR13 umiejscowiona jest w podjednostce 23S rybosomu bakteryjnego, czyli dokładnie w miejscu działania niektórych antybiotyków. W związku z tym uważa się, że nieodpowiednia terapia antybiotykowa może w przypadku niektórych patogenów doprowadzić do ich ukrycia zanim zostaną rozpoznane przez TLR13 (10, 43).

Ścieżka sygnałowa aktywowana przez receptor TLR13 nie jest jeszcze dobrze poznana. Wiadomo, że jako białko adaptorowe wykorzystywany jest MyD88 oraz że kinaza TAK1 zaangażowana jest w aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Wykazano ponadto, że TLR13 może być zaangażowany w odpowiedź przeciwwirusową. W tym przypadku rozpoznanie elementów wirusowych, które nie są do końca scharakteryzowane, prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego IRF7 i produkcji interferonu typu I (43, 44).

## **3.2. Receptory cytozolowe**

Kolejną ważną grupą receptorów zdolnych do wiązania egzogennej RNA i inicjacji kaskady sygnałowej prowadzącej do produkcji cytokin są białka niezwiązane z żadnym organellum, a więc umiejscowione w cytoplazmie. Obejmuje ona receptory z rodziny RLR oraz kinazę białkową zależną od RNA (PKR).

### **3.2.1. PKR**

Badania potwierdziły, że wysoki poziom kinazy PKR obserwowany jest w szpiku kostnym, grasicy i śledzionie, jednakże w większości komórek organizmu ulega ona ekspresji na niskim poziomie (45).

PKR pełni funkcję kinazy serynowo-treoninowej, której aktywność zależy od wiązania dsRNA. Wykazano, że za wiązanie to odpowiada *N*-końcowa część białka oraz że cząsteczki krótsze niż 30 pz nie są rozpoznawane przez kinazę. Jednocześnie im dłuższy jest wiązany fragment dsRNA tym skuteczniejsza aktywacja kinazy. Ponieważ

dłuższe fragmenty RNA pozwalają na łatwiejsze formowanie przez PKR homodimerów na nici kwasu nukleinowego, oraz aktywacji odpowiedzi immunologicznej (45, 46).

PKR uzyskuje pełną aktywność po związaniu RNA, autofosforylacji i dimeryzacji, a jej głównym zadaniem w komórce jest fosforylacja eIF2 $\alpha$  (podjednostki  $\alpha$  eukariotycznego czynnika inicjacji translacji (ang. alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2)). Skutkuje to zahamowaniem procesu inicjacji translacji w komórce. Proces ten dotyczy zarówno białek endogennych, jak i patogenów (47).

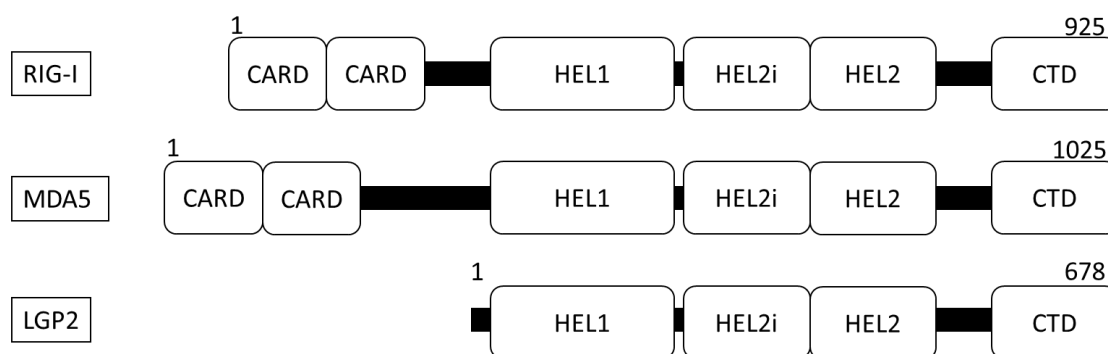
Niektóre doniesienia sugerują, że regulacja inicjacji translacji w trakcie infekcji nie jest jedynym mechanizmem działania PKR. Udowodniono, że zahamowanie aktywacji PKR z wykorzystaniem specyficznego inhibitora, jakim jest C16, skutkuje zwiększeniem zależnej od p38 produkcji IL-8 (48). Badania nad mechanizmem tego szlaku potwierdziły bezpośrednią interakcję PKR z białkiem MKK6 (ang. dual specificity mitogen-activated protein kinase 6) odpowiedzialnym za aktywację p38 (49, 50).

### 3.2.2. RLR

Rodzina receptorów RLR składa się z trzech białek: RIG-I, MDA5 oraz LGP2. Receptory tej grupy należą do nadrodziny helikaz z motywem DEAD/DEAH. Dzięki zdolności do indukcji produkcji cytokin po rozpoznaniu egzogennej RNA, mają one wielkie znaczenie dla odporności nieswoistej (51). Badania wykazały, że geny kodujące receptory RLR: *Ddx58* dla RIG-I, *Ifih1* dla MDA5 oraz *Dhx58* dla LGP2 ulegają ekspresji na niskim poziomie we wszystkich typach komórek, a poziom transkryptu wzrasta w następstwie kontaktu komórki z egzogennym dsRNA lub jego syntetycznym analogiem poly(I:C) (52–54).

Receptory należące do RLR charakteryzują się wspólnym ogólnym planem budowy. Białka RIG-I oraz MDA5 na *N* – końcu posiadają dwie domeny CARD (ang. caspase activation and recruitment domain), które odpowiedzialne są za przekazanie sygnału na zakotwiczone w błonie zewnętrznej mitochondriów białko adaptorowe MAVS (ang. mitochondrial antiviral signaling protein). Wyjątkiem jest białko LGP2, które pozbawione jest domeny CARD. Natomiast we wszystkich RLR obecne są domeny helikaz z motywem DEAD/DEAH. W sekwencji każdego z trzech receptorów można znaleźć aż trzy takie domeny nazwane kolejno HEL1, HEL2i oraz HEL2, przy czym domena HEL2i jest znacznie krótsza od pozostałych. Te charakterystyczne struktury

odpowiedzialne są za wiązanie RNA przez białka z rodziny RLR. Ostatnią domeną, która jest właściwa dla wszystkich receptorów RLR jest C – końcowa domena CTD (ang. C-terminal domain). Odpowiada ona za wiązanie trzech reszt fosforanowych na 5' końcu dsRNA (55, 56) (Ryc. 1).



**Ryc. 1 Schemat struktury domenowej białek RIG-I, MDA5 oraz LGP2.**

W niektórych przypadkach dochodzi do sytuacji, w której cząsteczki endogennego dsRNA znajdują się w cytozolu i mogą wtedy stać się celem dla receptorów RLR (57). Sposobem na ich ukrycie przed receptorami RLR jest m.in. synteza cząsteczek pozbawionych trzech reszt fosforanowych na 5' końcu lub synteza czapeczki z 7-metyloguanozyną. To w połączeniu z faktem, że endogenne cząsteczki RNA występujące w cytozolu są bardzo krótkie i najczęściej nie przekraczają 30 pz, czyni je niewykrywalnymi przez RLR (58).

Dodatkowo, RIG-I jest zdolny do wiązania i uruchomienia kaskady sygnałowej po rozpoznaniu ssRNA, które posiada trzy reszty fosforanowe na 5' końcu. Może nią być np. cząsteczka 7 SL RNA. W takim przypadku funkcję zabezpieczającą przed receptorami własnego układu odpornościowego pełnią modyfikacje zasad budujących cząsteczki RNA np. 2'-O-metylacja. Ta i inne modyfikacje wprowadzają w łańcuch RNA duże zmiany w konformacji lub zmiany w rozmieszczeniu ładunku elektrostatycznego, które skutkują tym, że cząsteczki RNA nie mogą zostać związane przez białka rodziny RLR (59). Wszystkie modyfikacje, którym poddawany jest RNA zachodzą wyłącznie w jądrze komórkowym i jedynie niezmodyfikowane cząsteczki tego kwasu są dla komórki pochodzenia obcego (58).



### 3.2.2.1. RIG-I

RIG-I został odkryty jako receptor rozpoznający krótkie, liczące około 1000 pz, odcinki dsRNA. Białko to jest jednak zdolne do wiązania również znacznie krótszych cząsteczek, a właściwość tą wykorzystuje się w badaniach *in vitro*, podczas których jako ligand dla RIG-I używane są fragmenty dsRNA o długości 19-24 pz. Dodatkową cechą charakterystyczną dla agonistów RIG-I jest obecność trzech reszt fosforanowych na 5' końcu cząsteczki RNA (5'pppdsRNA), zwiększających immunogenność liganda (60). Dalsze badania nad fragmentami RNA zdolnymi do aktywacji RIG-I wykazały, że 5'pppssRNA oraz 5'ppdsRNA również aktywują kaskadę sygnałową, jednakże w mniejszym stopniu niż 5'pppdsRNA. Natomiast 5'ppssRNA oraz 5'pdsRNA nie są zdolne do uruchomienia szlaku sygnałowego zależnego od receptora RIG-I. Dzięki tym badaniom udało się sformułować wniosek, że kluczowe reszty fosforanowe zlokalizowane są w pozycji  $\alpha$  oraz  $\beta$  (61). Inne prace wskazują również na możliwość wiązania przez RIG-I dłuższych cząsteczek RNA pozbawionych reszt fosforanowych na 5' końcu, jednakże oddziaływanie to jest znacznie mniej wydajne i zachodzi z wykorzystaniem innych mechanizmów niż klasyczne rozpoznawanie liganda (62). W warunkach fizjologicznych potwierdzono udział RIG-I w rozpoznaniu materiału genetycznego oraz produktów transkrypcji i/lub replikacji wirusów z rodziny *Flaviviridae*, *Paramyxoviridae*, *Ortomyxoviridae*, *Rhabdoviridae* oraz *Reoviridae* (63).

W przeciwieństwie do receptorów z rodziny TLR zakotwiczonych w błonach endosomu niskie pH nie ma wpływu na wydajność wiązania liganda przez RIG-I. Obojętny odczyn środowiska cytoplazmatycznego stanowi idealne warunki dla prawidłowego działania receptorów z rodziny RLR (64). Mechanizm wiązania liganda opiera się o udział domen HEL1, HEL2 oraz CTD i zachodzi pomiędzy grupami amidowymi łańcucha aminokwasowego białka oraz grupami 2'hydroksylowymi łańcucha RNA. Dodatkowo, na wiązanie wpływają również oddziaływania elektrostatyczne między resztami dodatnie naładowanych aminokwasów znajdujących się w domenie CTD, a atomami tlenu reszt fosforanowych RNA (64).

W sytuacji, kiedy w komórce gospodarza nieobecne jest 5'pppdsRNA wirusa, RIG-I występuje w postaci nieaktywnej. Domeny helikaz (HEL1 i HEL2) przybierają konformację niewykazującą powinowactwa zarówno do ATP, jak i do RNA. Domena HEL2i poprzez bezpośrednie oddziaływanie z domeną CARD2 blokuje ubikwitynację CARD, a tym samym aktywację białka. Dodatkowo oddziaływanie to fizycznie blokuje

możliwość wiązania RNA do domen helikaz (64). Ten stan receptora RIG-I określany jest jako tzw. autorepresja i cechuje go specyficzne ułożenie domeny CTD. W takiej konformacji domena CTD jest dodatnio naładowana, dzięki czemu możliwe jest rozpoznanie i wiązanie specyficznych reszt fosforanowych znajdujących się na 5' końcu cząsteczki RNA. W sytuacji pojawienia się w cytozolu RNA wysokie powinowactwo CTD do 5'pppdsRNA prowadzi do zwiększenia lokalnego stężenia RNA i zmiany rozkładu ładunków elektrostatycznych w obrębie receptora. Konsekwencją tego jest zmiana konformacji domen helikaz, skutkująca związaniem ATP przez HEL1 i HEL2, zwiększając ich powinowactwo do RNA. Wiązanie ATP prowadzi do dalszych zmian konformacyjnych i do uwolnienia domen CARD od HEL2i. Równocześnie dochodzi do odblokowania przez domenę HEL2i domeny helikaz RNA. W rezultacie powstaje ściśle i bardzo mocne oddziaływanie białka z kwasem nukleinowym. Dochodzi do ubikwitynacji domen CARD i powstały kompleks nukleoproteiny gotowy jest do przekazania sygnału na białko adaptorowe MAVS (62). Do pełnej aktywacji receptora potrzebne są co najmniej cztery cząsteczki ubikwityny połączone przez lizynę w pozycji 63 (K63), a głównym białkiem odpowiedzialnym za ubikwitynację RIG-I jest TRIM25 (ang. tripartite motif-containing protein 25) (65). Struktura w pełni aktywowanego białka RIG-I daje mu również aktywność hydrolazy ATP. Dzięki tej właściwości cząsteczka receptora zdolna jest do przemieszczania się wzdłuż łańcucha związanego RNA oraz tworzenia tetramerów. Formowanie dużego kompleksu pozwala na amplifikację sygnału otrzymanego z pojedynczej nici egzogennej RNA (66). Dodatkowo RIG-I nie traci swojej zdolności do aktywacji ścieżki sygnałowej nawet po oddysocjowaniu liganda. Dopiero deubikwitynacja prowadzi do inaktywacji receptora i umożliwia jego ponowną aktywację (62, 64).

### 3.2.2.2. *MDA5*

Kolejnym receptorem z rodziny RLR jest MDA5. Od receptora RIG-I odróżnia go między innymi rozmiar rozpoznawanej cząsteczki dsRNA oraz dużo większe powinowactwo do RNA pozbawionego reszt fosforanowych na 5' końcu. Ligandem dla MDA5 jest RNA o długości powyżej 1000 pz z dużą zawartością adeniny i uracylu, które, jak wspomniano wyżej, nie musi zawierać dodatkowych modyfikacji końców (55, 67). W warunkach laboratoryjnych do badań nad MDA5 wykorzystywany jest syntetyczny ligand poly(I:C). Udowodniono, że receptor MDA5 bierze udział w rozpoznaniu

konkretnego regionu w genomie wirusa PIV5 (*Parainfluenza virus 5*) kodującego białko L (ang. large protein) oraz uczestniczy w rozpoznawaniu wirusów z rodziny *Picornaviridae* (68, 69).

Budowa liganda dla MDA5 umożliwia receptorowi tworzenie długich, składających się z co najmniej jedenastu cząsteczek filamentów, które układają się helikalnie wzdłuż nici RNA. Znacznie zmniejszony, w porównaniu do RIG-I, poziom hydrolizy ATP, wynikający najprawdopodobniej z dużej zawartości zasad A i U w rozpoznawanej nici, redukuje możliwość translokacji receptora po nici RNA. Skutkuje to utworzeniem długiego i trwałego polimeru składającego się z białek MDA5, który przekazuje sygnał na białko adaptorowe MAVS (55, 67).

### **3.2.2.3. LGP2**

Ostatnim receptorem z rodziny RLR jest LGP2, który nie jest w pełni funkcjonalny, gdyż nie może aktywować żadnej ścieżki sygnałowej. Wynika to z braku w jego budowie domen CARD odpowiedzialnych za przekazywanie sygnału na białko adaptorowe (70, 71).

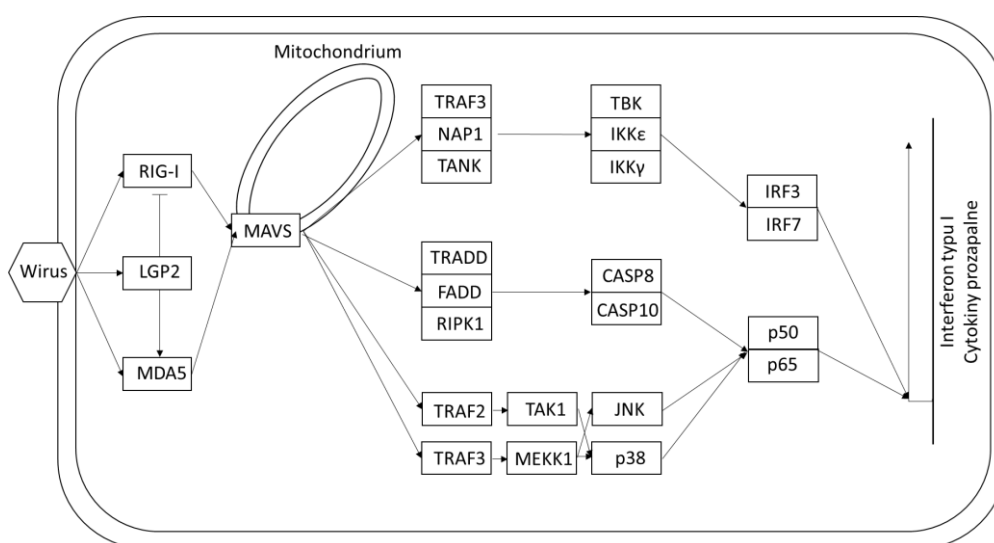
LGP2 zdolny jest jednak do prawidłowego wiązania cząsteczek RNA podobnych do tych wiązanych zarówno przez RIG-I, jak i MDA5. W związku z tym badacze sugerują, że LGP2 pełni rolę regulatorową i wpływa na zachowanie równowagi w aktywacji pozostałych receptorów rodziny RLR (71). W przypadku RIG-I wiązanie 5'pppdsRNA przez LGP2 zmniejsza dostępność liganda dla RIG-I, uniemożliwiając jego prawidłowe rozpoznanie i dalszą aktywację sygnału (52, 72). Jednocześnie wiązanie LGP2 do cząsteczek rozpoznawanych przez MDA5 ułatwia rozpoznanie i tworzenie polimerów MDA5 na nici RNA, promując w ten sposób aktywację ścieżki sygnałowej zależnej od MDA5 (58, 73).

### **3.2.2.4. Szlak sygnałowy aktywowany przez RLR**

Sygnał powstały po rozpoznaniu i związaniu liganda przez receptory z rodziny RLR przekazywany jest na białko adaptorowe MAVS, które zakotwiczone jest w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Wykazano, że po infekcji wirusowej i pod wpływem receptorów RLR, MAVS formuje agregaty, podobne w strukturze do białek prionowych, pomagające

w amplifikacji sygnału inicjowanego przez RIG-I lub MDA5. Dodatkowo wykazano, że tworzenie agregatów przez MAVS konieczne jest do rekrutacji białek z rodziny TRAF (74–77).

Sygnał inicjowany przez białko adaptorowe może aktywować kilka kaskad sygnałowych. Pierwsza z nich wykorzystuje ligazę ubikwityny TRAF3, która po aktywacji przez MAVS tworzy kompleks z NAP1. Prowadzi to do rekrutacji białka TANK (ang. TRAF family member-associated NF-kappa-B activat) i aktywacji kinaz TBK1 (ang. TANK-binding kinase 1), IKK $\epsilon$  oraz IKK $\gamma$ . Aktywowane kinazy tworzą kompleks, który zdolny jest do fosforylacji czynników transkrypcyjnych IRF3/7, co prowadzi do ich dimeryzacji, translokacji do jądra komórkowego i w efekcie do rozpoczęcia produkcji interferonu typu I (53, 78, 79) (Ryc. 2). Druga ścieżka prowadzi do aktywacji białek TRAF2 i TRAF6, które aktywują odpowiednio TAK1 oraz MEKK1 (ang. mitogen-activated protein kinase 1). Dalsza propagacja sygnału aktywuje kinazy MAP, takie jak JNK (ang. c-Jun *N*-terminal kinase 1) i p38 oraz prowadzi do kanonicznej aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, a w konsekwencji do produkcji cytokin prozapalnych (53, 78, 80) (Ryc. 2). Trzeci szlak sygnałowy opiera się na aktywacji przez MAVS białka TRADD (ang. tumor necrosis factor receptor type 1 associated DEATH domain protein) oraz rekrutacji kompleksu białek FADD (ang. FAS associated death domain protein) i RIPK1 (ang. receptor interacting serine/threonine protein kinase 1). Prowadzi to do kanonicznej aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B oraz aktywacji produkcji interferonu typu I i cytokin prozapalnych (81) (Ryc. 2).



**Ryc. 2** Schemat szlaków sygnałowych aktywowanych przez receptory RLR.

### 3.3. Rodzina białek Pellino

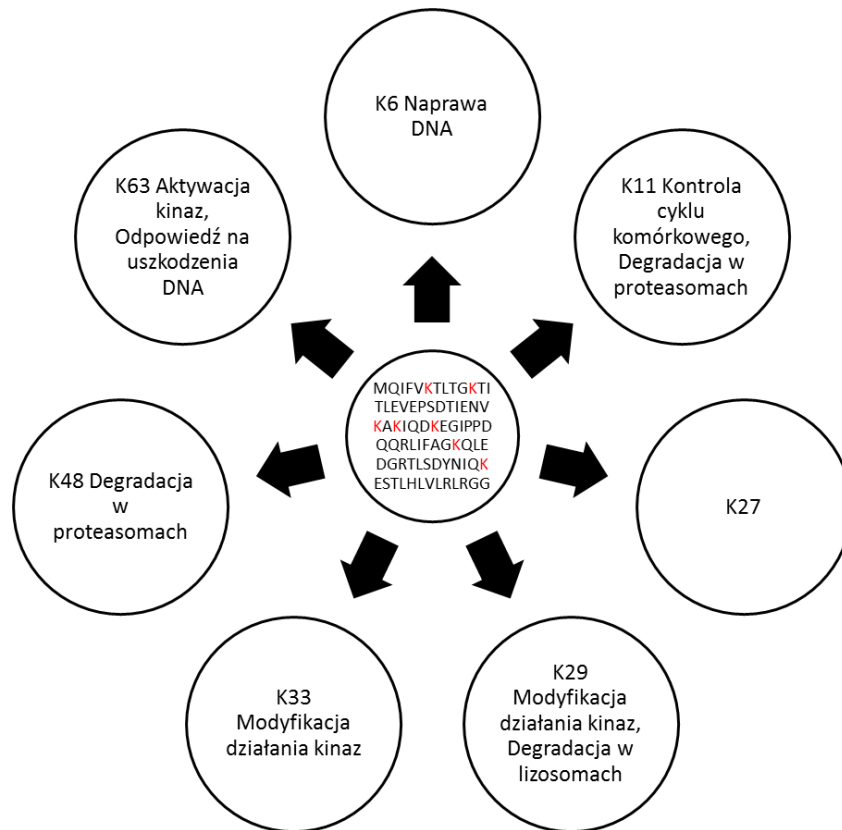
Pellino po raz pierwszy zostało opisane w 1999r. przez zespół Christiane Nüsslein-Volhard u wywilźni karłowatej (*Drosophila melanogaster*) jako białko specyficznym wiążące ufosforylowaną i aktywną formę kinazy serynowo-treoninowej Pelle, pełniąc w ten sposób rolę rusztowania dla szlaku sygnałowego Toll (82). Pelle natomiast opisane zostało jako białko pełniące ważną rolę w szlaku sygnałowym receptora Tl (ang. Toll receptor), a tym samym w ustaleniu polarności embrionu wywilźni, jak również indukcji produkcji przeciwgrzybicznego białka drosomycyny u dorosłych osobników. Pelle charakteryzuje się wysokim stopniem homologii do ludzkiej kinazy IRAK, która pełni istotną funkcję w szlaku sygnałowym aktywowanym przez receptory TLR u ssaków. Autorzy na podstawie wysokiej homologii genu *Pli* kodującego opisane przez nich białko Pellino do genów obecnych w materiale genetycznym nicieni, myszy i ludzi postulowali obecność podobnego białka w organizmach wyższych. Ponadto zasugerowali, że Pellino mogłoby oddziaływać z kinazą IRAK na podobnej zasadzie jak u wywilźni oddziałuje z Pelle (82). W kolejnych latach potwierdzono obecność w genomach nicieni, myszy i człowieka funkcjonalnych genów homologicznych do *Pli* nazwanych odpowiednio *pele-1*, *Peli1* oraz *PELI1*. Badacze odkryli również, że w genomach myszy i człowieka istnieją dodatkowe geny charakteryzujące się wysokim stopniem homologii do genu *Pli*. Geny te nazwano odpowiednio *Peli2* oraz *PELI2* (83). Trzeci gen, kodujący białko z rodziny Pellino, został odkryty w 2003 roku podczas przeszukiwania baz NCBI EST. Gen ten został nazwany *PELI3*, eksperymentalnie natomiast wykazano, że ulega on ekspresji w dwóch wariantach: dłuższym, który nazwano Pellino3a oraz krótszym, nazwanym Pellino3b (84).

#### 3.3.1. Funkcje, budowa i modyfikacje białek Pellino

Wszystkie białka z rodziny Pellino są transferazami ubikwityny E3 typu RING (ang. really interesting new gene) i biorą udział w procesie ubikwitynacji białek. Ubikwitynacja to posttranslacyjny sposób modyfikacji białek polegający na kowalencyjnym dołączeniu do nich reszt ubikwityny, czyli siedemdziesięciosześcioro aminokwasowego peptydu. System ubikwitynacji białek jest złożonym procesem enzymatycznym regulowanym na

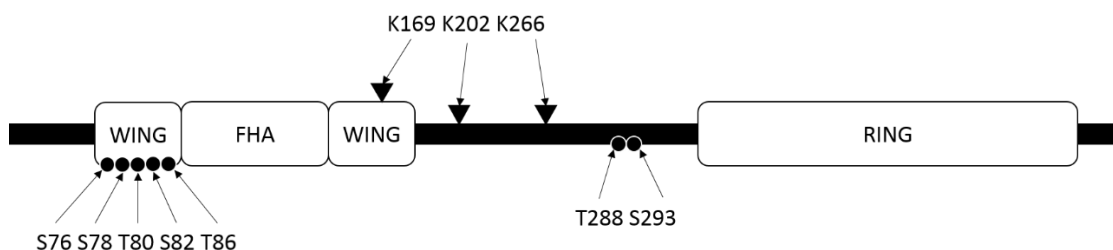
wielu poziomach. W pierwszym etapie dochodzi do aktywacji ubikwityny przez białko E1, które tworzy wiązanie tioestrowe między C – końcem ubikwityny, a cysteiną w miejscu aktywnym E1. Proces ten zależny jest od ATP. W proteomie człowieka znane są jedynie dwa enzymy E1: UBA1 oraz UBA6 (ang. ubiquitin-associated domain). Drugi etap polega na przeniesieniu łańcucha ubikwityny z białka E1 na białko E2. W ostatnim etapie enzymy E3 pośredniczą w przeniesieniu ubikwityny z białka E2 na białko docelowe. Ligazy ubikwityny E3 typu RING, takie jak Pellino nie są nigdy akceptorami dla przenoszonej ubikwityny. Stanowią one jedynie platformę, bez której nie może zajść transfer z białka E2 na białko docelowe (85, 86). Pierwszy łańcuch ubikwityny dołączany jest przez jego C-końcową część do reszty lizyny w modyfikowanym białku. Kolejne łańcuchy ubikwityny mogą być dołączane jako łańcuch liniowy lub rozgałęziony. Możliwe są rozgałęzienia w K6, K11, K27, K29, K33, K48 oraz K63, a każdy rodzaj rozgałęzienia może nadawać białku inną funkcjonalność bądź kierować je do degradacji (Ryc. 3).

Najczęściej występującymi w komórce rodzajami ubikwitynacji są: modyfikacja K48, która kieruje białka do degradacji w proteasomie oraz modyfikacja K63, która może prowadzić do aktywacji kinaz przez tworzenie miejsca do przyłączenia innych białek (87, 88).



**Ryc. 3 Rodzaje modyfikacji białek przez różne rodzaje rozgałęzień łańcucha ubikwityny.**

Badania bioinformatyczne sugerowały obecność w C-końcowej części Pellino charakterystycznego wzoru powtarzających się cystein oraz histydyn właściwych dla motywu RING (83). Kolejne odkrycie przyniosło krystalograficzne opisanie N-końcowej części Pellino2. Badacze zidentyfikowali domenę FHA (ang. forkhead-associated domain), która odpowiedzialna jest za wiązanie ufosforylowanych reszt treoniny. Otoczona jest ona fragmentami nazwanymi WING, nieobserwowanymi wcześniej przy innych znanych domenach FHA. Dodatkowo udowodniono, że rdzeń domeny FHA jest konserwowany w całej rodzinie Pellino (89). Białka Pellino podlegają licznym modyfikacjom posttranslacyjnym, które najlepiej opisane są dla Pellino1. Jest ono fosforylowane przez kinazy IRAK1 oraz IRAK4 na resztach seryny 76, 78, 82, 293 oraz treoniny 80, 86, 288, a także, choć w mniejszym stopniu, przez TBK1 na resztach seryny 76 i 80. Fosforylacja jednej z wymienionych reszt jest wystarczająca do uzyskania pełnej aktywności przez ligazę (90–92). Z kolei autoubikwitynacja lizyn 169, 202 oraz 266 najprawdopodobniej jest sygnałem do degradacji i wynika z konieczności kontrolowania aktywności Pellino po aktywacji przez kinazy IRAK1 i 4 oraz TBK1 (93, 94)(Ryc. 4).



Ryc. 4 Miejsca potwierdzonych modyfikacji białka Pellino1.

### 3.3.2. Pellino1

Ligaza ubikwitynowo-białkowa typu E3 pellino 1 (Pellino1) jest białkiem zaangażowanym w szereg ścieżek sygnałowych związanych ze stanem zapalnym oraz rozpoznaniem molekularnych wzorców związanych z patogenami.

Białko to zostało zidentyfikowane po raz pierwszy jako czynnik pozytywnie regulujący szlak sygnałowy aktywowany przez receptor IL-1R. Jest to możliwe dzięki stabilizacji kompleksu IRAK4-IRAK1-TRAF6, który wpływa na aktywację NF- $\kappa$ B, a w konsekwencji prowadzi do produkcji IL-8 oraz innych cytokin prozapalnych (95, 96). Udowodniono również, że wiązanie Pellino1 przez białka SMAD6 i SMAD7 po ich aktywacji przez TGF (ang. transforming growth factor) skutkuje destabilizacją wspomnianego wyżej kompleksu i zablokowaniem aktywacji produkcji cytokin prozapalnych (97, 98).

Pellino1 pełni również ważną rolę w kaskadach sygnałowych aktywowanych przez TLR3 oraz TLR4, które są zależne od białka adaptorowego TRIF. Wykazano, że myszy z nokautem w genie kodującym białko Pellino1 są mniej narażone na szok septyczny wywołany podaniem poly(I:C) oraz LPS. Wynika to ze znacznie obniżonej aktywacji NF- $\kappa$ B oraz obniżonej produkcji cytokin prozapalnych, takich jak TNF $\alpha$ , IL-6 oraz IL-12 (99). Proponowanym mechanizmem działania białka Pellino1 w ścieżce sygnałowej aktywowanej przez TLR3 i 4 jest fosforylacja Pellino1 przez kompleks IKK- $\epsilon$ -TBK1. Dzięki aktywacji Pellino1 jest zdolne do ubikwitynacji białka RIP1, które w ubikwitynowanej formie stanowi molekularną platformę, na której zachodzi aktywacja kompleksu TAK1-IKK $\alpha/\beta$ , a następnie aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (93, 100, 101). Dodatkowo zaobserwowano, że brak białka Pellino1 wpływa jedynie na poziom produkcji cytokin prozapalnych, nie zaburzając jednocześnie ścieżki prowadzącej do produkcji interferonu typu I czy IP-10 (96, 99).



Pellino1 jest zaangażowane również w regulację stanu zapalnego w układzie nerwowym. Wykazano, że w mózgach pacjentów chorych na stwardnienie rozsiane jest znacznie podwyższony poziom ekspresji tego białka w porównaniu z mózgami zdrowych dawców. Jednocześnie zaobserwowano, że objawy eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE ang. experimental autoimmune encephalomyelitis) są znacznie mniej dotkliwe u myszy z nokautem w genie kodującym białko Pellino1. Wykazano ponadto, że komórki mikrogleju z nokautem Pellino1 nie produkują cytokin prozapalnych po aktywacji zależnych od MyD88 ścieżek sygnałowych receptorów TLR1/2, TLR7 oraz TLR9. Mechanizm molekularny związany z brakiem aktywacji produkcji cytokin prozapalnych opiera się o brak ubikwitynacji IAP2 przez Pellino1, co w konsekwencji skutkuje stabilizacją białka TRAF3 oraz mniejszym stopniem aktywacji kinaz MAP, takich jak ERK, JNK i p38 (102).

W limfocytach T po stymulacji receptorów TCR (ang. *T-cell receptor*) i CD28 dochodzi do zwiększonej ekspresji białka Pellino1, które ubikwitynuje czynnik transkrypcyjny REL kierując go do degradacji, a tym samym negatywnie wpływa na poziom ekspresji IL-2. Udowodniono, że u myszy z nokautem w genie kodującym białko Pellino1 dochodzi do akumulacji czynnika REL w jądrze i znacznie zwiększonej ekspresji IL-2, co w dłuższym okresie związanym ze starzeniem się myszy, prowadzi do rozwoju schorzeń autoimmunologicznych związanych ze zmniejszoną możliwością nabycia tolerancji na własne antygeny (103, 104).

### 3.3.3. Pellino2

Pellino2 jest najslabiej poznanym białkiem z rodziny Pellino. Podobnie jak Pellino1 jest transferazą ubikwityny E3 typu RING. Białko to zostało zidentyfikowane jako regulator szlaku sygnałowego, aktywowanego przez receptory IL-1R i TLR, prowadzącego do indukcji ekspresji genów zależnych od czynnika NF- $\kappa$ B. Dodatkowo udowodniono, że Pellino2 oddziałuje z białkami IRAK1, IRAK4, TRAF6, a także TAK1 (90, 105). Niezależne badania wykazały, że nadekspresja Pellino2 w komórce prowadzi również do wzrostu aktywacji kinaz MAP tj. ERK i JNK, a nokaut genu *Peli2* manifestuje się brakiem aktywacji komórek po stymulacji IL-1 $\beta$  i LPS (105, 106). Potwierdzono również udział białka Pellino2 w szlaku sygnałowym receptorów TLR4-MD2 w odpowiedzi na LPS. W tym przypadku białko adaptorowe BCL10 (ang.

B-cell lymphoma/leukemia 10) oddziałuje z białkiem Pellino2 i prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. Zaburzenie tego oddziaływania przez SOCS3 (ang. Suppressor of cytokine signaling) skutkuje brakiem aktywacji czynnika (107).

### 3.3.4. Pellino3

Białko Pellino3 zostało opisane po raz pierwszy w 2003 roku. W zasobach GeneBank zidentyfikowano wtedy dwie sekwencje wykazujące dużą homologię do znanych sekwencji kodujących białko Pellino1 i Pellino2, odpowiednio 84% oraz 85%. Dwie nowo poznane sekwencje różnią się między sobą insertem kodującym 24 dodatkowe aminokwasy. Wykazano, że obie sekwencje umiejscowione są w tym samym loci na chromosomie 11, co pozwala twierdzić, że są one dwoma wariantami transkrypcyjnymi jednego genu. Nowy gen składa się z ośmiu egzonów, a trzeci egzon zawiera sekwencję kodującą dodatkowe 24 aminokwasy występujące tylko w jednej formie białka. Nowe białka ze względu na wspomnianą wcześniej homologię nazwano Pellino3a (forma długa) oraz Pellino3b (forma krótka) (84).

Pellino3 na poziomie mRNA obecne jest we wszystkich tkankach organizmu. W mózgu, sercu oraz jądrach obserwuje się znacznie wyższy poziom transkryptu genu *Peli3* niż w pozostałych tkankach. Co ciekawe, we wszystkich tkankach występuje mRNA kodujący obie formy białka. Jedynym wyjątkiem są płuca, gdzie obserwowany jest jedynie transkrypt kodujący formę krótką (84).

Do białek bezpośrednio rekrutowanych przez ligazę Pellino3 należą: IRAK1, TRAF6, TAK1 oraz NIK (ang. mitogen-activated protein kinase 14), a oddziaływanie to jest zależne od aktywacji receptora IL-1R (84). Powstały kompleks sygnałowy inicjuje aktywację kinaz MAP: JNK i p38, co w efekcie prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych c-JUN, ELK-1 (ang. ETS domain-containing protein) oraz CREB (ang. cyclic AMP-responsive element-binding protein 1) (84, 108, 109). Równoległe wykazano, że Pellino3b negatywnie reguluje, zależną od IL-1, aktywację NF- $\kappa$ B (110).

W przypadku receptora TLR2 wykazano, że nadekspresja zarówno krótkiej, jak i długiej formy białka Pellino3 w komórkach HEK-TLR2, które traktowano Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> oraz LPS izolowanym z *Helicobacter pylori* prowadzi do zmniejszenia aktywności NF- $\kappa$ B oraz pobudzenia promotorów genów *Cxcl8* oraz *Ccl20*. Jednocześnie na tym samym modelu komórkowym z wyciszoną ekspresją genu *Peli3* zaobserwowano

zwiększoną aktywację NF- $\kappa$ B oraz pobudzenie promotorów genów *Cxcl8* oraz *Ccl20*. Pozwala to wnioskować, że Pellino3 może pełnić funkcję negatywnego regulatora szlaku sygnałowego aktywowanego przez receptor TLR2 (111, 112).

Pellino3 wpływa również na szlak sygnałowy aktywowany przez TLR3. Myszy z nokautem genu *Peli3* oraz wyizolowane z nich komórki MEF i BMDM stymulowane syntetycznym ligandem dla TLR3 (poly(I:C)) oraz wirusem EMCV (ang. encephalomyocarditis virus), charakteryzują się zwiększonym poziomem ekspresji genów *Ifnb1*, *Ccl5* oraz *Cxcl10*. Mechanizm leżący u podstaw zwiększonej produkcji IFN $\beta$  oraz związanej z tym większej przeżywalności myszy zainfekowanych wirusem EMCV związany jest z oddziaływaniem białka Pellino3 z TRAF6. Ligaza Pellino3 na zasadzie negatywnej pętli zwrotnej inaktywuje białko TRAF6, co skutkuje zahamowaniem aktywacji czynnika transkrypcyjnego IRF7. W konsekwencji prowadzi to do zahamowania ekspresji genu *Ifnb1*. W przypadku braku w komórkach białka Pellino3 produkcja IFN $\beta$  nie jest zatrzymywana/limitowana (113).

Kolejnym receptorem z rodziny TLR, regulowanym przez białko Pellino3 jest TLR4. Obecność białka Pellino3 wynikająca z pobudzenia receptora A1 przez utlenioną formę lipoproteiny niskiej gęstości (oxLDL, ang. oxidized low-density lipoprotein) prowadzi do monoubikwitynacji białka TANK. Proces ten wpływa na szlak sygnałowy aktywowany przez receptor TLR4 po rozpoznaniu cząsteczki LPS. Wspomniana ubikwitynacja TANK, po stymulacji komórek lipopolisacharydem, znacznie osłabia aktywację czynnika transkrypcyjnego IRF3, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia poziomu produkcji IFN $\beta$  (114). Dodatkowo wykazano wpływ Pellino3 na zależny od TLR4 poziom aktywacji NF- $\kappa$ B oraz ekspresję genu kodującego IL-8 (112).

W przypadku receptorów wewnątrzkomórkowych Pellino3 wpływa na szlak sygnałowy receptora NOD2 (należącego do rodziny NLR (ang. NOD like receptor)). NOD2 rozpoznaje dipeptyd muramylowy (MDP ang. muramyl dipeptide), który jest składnikiem bakteryjnej ściany komórkowej. Wykazano, że Pellino3 wspomaga zależną od NOD2 ubikwitynację białka RIP2, a co za tym idzie umożliwia stworzenie kompleksu białek TAK1 i IKK. Prowadzi to do aktywacji kinaz z rodziny MAP oraz czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, co w konsekwencji uruchamia ekspresję cytokin prozapalnych oraz peptydów bakteriobójczych (115).

Potwierdzono również udział Pellino3 w regulacji proapoptotycznego działania TNF $\alpha$ . Stymulacja komórek za pośrednictwem TNF $\alpha$  prowadzi do powstania kompleksu złożonego z białka RIP1 oraz szeregu ligaz ubikwityny, takich jak TRAF2, TRAF5, IAP1

oraz IAP2. Powstanie tego kompleksu warunkuje ubikwitynację RIP1 oraz rekrutację kolejnego kompleksu złożonego z białek TAK1 i IKK. Podobnie jak w przypadku receptora NOD2 skutkuje to aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B oraz ekspresją genów kodujących białka antyapoptotyczne (116). Deubikwitynacja białka RIP1, zwiększa jego powinowactwo do białka FADD, co prowadzi do stworzenia z pomocą prokaspazy 8 kompleksu sygnalizacyjnego wywołującego śmierć (DISK ang. death-inducing signaling complex) (116). Wykazano, że Pellino3 potrafi zablokować oddziaływanie RIP1 z FADD dzięki wiązaniu się do RIP1 za pośrednictwem domeny FHA. Udowodniono również, że Pellino3 nie musi być katalitycznie aktywne aby zablokować to oddziaływanie i jest ono całkowicie niezależne od domeny RING (117).

## 4. Cel pracy

Ubikwitynacja jest najbardziej powszechnym sposobem modyfikacji białek w komórce. Pełni ona różnorodne funkcje takie jak: kierowanie białek do degradacji, modyfikowanie cyklu komórkowego, czy aktywację konkretnych białek w szlakach sygnałowych. Ligazy ubikwityny w ostatnim czasie przyciągają uwagę badaczy z wielu dziedzin biologii, od nauk podstawowych, gdzie określa się ich rolę w organizmach, po badania aplikacyjne, w których to podejmowane są próby wykorzystania ich funkcji w terapii lub diagnostyce.

Ligaza ubikwityny Pellino3 została scharakteryzowana jako białko biorące udział w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Wpływa ono na szlaki sygnałowe aktywowane przez szereg receptorów w komórce, między innymi z grup TLR i NOD. W niniejszej pracy postanowiono zbadać czy białko Pellino3 wpływa również na odpowiedź przeciwwirusową zależną od receptorów z rodziny RLR. W tym celu zaplanowano wykonanie kompleksowej analizy profilu cytokin produkowanych w odpowiedzi na infekcję VSIV w komórkach dzikich oraz z nokautem genu *Peli3*. Ponadto podjęto próbę wyjaśnienia w jaki sposób Pellino3 reguluje produkcję mRNA i białek dla IFN $\beta$ , IP-10 oraz TNF $\alpha$ . Badania przeprowadzono na liniach komórkowych mysich makrofagów pochodzenia szpikowego typu dzikiego oraz z nokautem genu *Peli3*.

## 5. Materiały i metody

### 5.1. Materiały

#### 5.1.1. Odczynniki chemiczne i reagenty

2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, Hercules, USA
10x bufor reakcyjny dla DNazy I z dodatkiem MnCl <sub>2</sub>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Agaroza	Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy
Akrylamid/Bisakrylamid 37,5:1 roztwór 30%	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Albumina surowicy wołowej	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Bambanker	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Niemcy
Blastocydyna	Invivogen, San Diego, USA
Błękit trypanu	Bio-Rad, Hercules, USA
Bufor do polimerazy DNA RedTaq 10x	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Bufor obciążający DNA Gel Loading Dye 6x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Chlorek potasu	POCh, Gliwice
Chlorek sodu	POCh, Gliwice
Chloroform	POCh, Gliwice
Deoksycholan sodu	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Deoksyrybonukleotydy	Promega, Fitchburg, USA
Ditiotreitol (DTT)	LOBA-Chemie, Mumbai, Indie
Diwodorofosforan potasu	POCh, Gliwice
DNaza I wolna od RNaz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	Serva, Hedelberg, Niemcy
Etanol	POCh, Gliwice
FR180204	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Glicyna	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Igepal	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Izopropanol	POCh, Gliwice
Kazeina	BDH/VWR International, Radnor, USA

Koktajl inhibitorów proteaz cOPMLETE Mini EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy
Koktajl inhibitorów fosfataz PhosSTOP Mini EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy
Kwas wersenowy (EDTA)	POCh, Gliwice
Kwas octowy	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Medium DMEM	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Medium RPMI	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Metanol	POCh, Gliwice
Midori Green Advance	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Niemcy
Molekularne standardy cząsteczkowych mas białkowych	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Molekularne standardy mas DNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nadsiarczan amonu (APS)	Fluka, Bachs, Szwajcaria
Nitroceluloza	Bio-Rad, Hercules, USA
N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Normocyna	Invivogen, San Diego, USA
Plodowa surowica bydlęca (FBS)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Polimeraza DNA RedTaq	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
PureZOL odczynnik do izolacji RNA	Bio-Rad, Hercules, USA
QUANTI-Blue	Invivogen, San Diego, USA
QUANTI-Luc	Invivogen, San Diego, USA
Sól fizjologiczna buforowana fosforanem bez jonów wapnia i magnezu (PBS)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tris-HCl	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Trypsyna 10x	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Tween-20	Serva, Hedelberg, Niemcy
Wodorofosforan sodu	POCh, Gliwice
Zeocyna	Invivogen, San Diego, USA

### 5.1.2. Zestawy gotowe

<b>Zestaw do odwrotnej transkrypcji: iScript Reverse Transcription Supermix for RT-PCR</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
--	------------------------

Zestaw do reakcji PCR w czasie rzeczywistym: iTaq Uniwersal SYBR Green Supermix	Bio-Rad, Hercules, USA
Zestaw do oznaczania biologicznie aktywnych interferonów typu I: B16-Blue IFN $\alpha$ / $\beta$ Cells	Invivogen, San Diego, USA
Zestaw ELISA do oznaczania mysiego TNF $\alpha$ : Mouse TNF-alfa DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Zestaw ELISA do oznaczania mysiego IP-10: Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA

### 5.1.3. Sekwencje oligonukleotydowe

Gen	Sekwencja 5' → 3'	Wielkość fragmentu (pz)
<i>Hprt</i>	F: GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCTCGAAG R: CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT	93
<i>Ifn<math>\beta</math></i>	F: GGAGATGACGGAGAAGATGC R: CCCAGTGCTGGAGAAATTGT	83
<i>Tnfa</i>	F: CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA R: TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	174
<i>Ip-10</i>	F: GCCATGGTCCTGAGACAAA R: AGCTTACAGTACAGAGCTAGGA	90
<i>Ddx58</i>	F: ACAAACCGGGCAACAGGAAT R: CAATGCCTTCATCAGCGACC	115
<i>L-gen</i>	F: GCTCAACCCATGTCTCACCA R: TTGGGCGGAATCATGCTGAA	77
<i>Ifih1</i>	F: AACACGACAGAGCACCTACG R: TTGTTTCACTCTGAGTCATGGGC	136
<i>Mavs</i>	F: CGCAGCAAATGTTGCCTCTG R: TTTGTCCTCAGGGCAGTACG	96
<i>Peli3</i>	F: CTCACCATTTGGGGGAAAGGA R: TCTTTATCCCACACTTACACACAGT	685

pz – liczba par zasad, temperatura parowania oligonukleotydów: 60°C



#### 5.1.4. Przeciwciała

Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie ERK1/2	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ERK1/2	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko $\beta$ -aktynie	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie p38	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko p38	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie JNK	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko JNK	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała mysie skierowane przeciwko I $\kappa$ B $\alpha$	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie IRF7	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie IRF3	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie (Thr389) p70S6	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie (Ser371) p70S6	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko p70S6	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie (Ser380) p90RSK	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko eIF4A	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie eIF4B	Cell Signaling Technology, USA
Przeciwciała królicze skierowane przeciwko fosforylowanej formie eIF4E	Cell Signaling Technology, USA

Przeciwciała ośle skierowane przeciwko łańcuchowi ciężkiemu IgG myszy skoniugowane z fluoroforem IRDye 680W	LiCor, USA
Przeciwciała ośle skierowane przeciwko łańcuchowi ciężkiemu IgG królika skoniugowane z fluoroforem IRDye 800W	LiCor, USA

### 5.1.5. Bufory i żele

<b>HS</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,5 5 M NaCl 0,5% Igepal 50 mM NaF 0,1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> inhibitory proteaz: (2,5 mg/ml leupeptyna, 2,5 mg/ml aprotynina, 15 mg/ml benzamidyna, 1 mg/ml trypsyna) 0,1 M PMSF 0,5 mM ditiotreitrol 0,25% deoksychoolan sodu
<b>TAE</b>	40 mM Tris 20 mM kwas octowy 2 mM EDTA
<b>4x górny bufor Tris pH 6,8</b>	0,5 M Tris pH 6,8 0,4% SDS
<b>4x dolny bufor Tris pH 8,8</b>	1,5 M Tris pH 8,8 0,4% SDS
<b>bufor elektrodowy do SDS-PAGE</b>	25 mM Tris 192 mM glicyna 0,1% SDS
<b>bufor do transferu</b>	25 mM Tris pH 8,5 192 mM glicyna 20% methanol
<b>TBS</b>	50 mM Tris-HCl 0,9% NaCl
<b>TBS-T</b>	50 mM Tris-HCl 0,9% NaCl 0,05% Tween 20

<b>żel zagęszczający 5% (10ml)</b>	Rotiphorese Gel (37,5:1) 3,3 ml 4x upper Tris 5 mL H <sub>2</sub> O 11,6 mL 10% APS 60 µl TEMED 20 µl
<b>żel rozdzielający 12% (20ml)</b>	Rotiphorese Gel (37,5:1) 10 ml 4x lower Tris 6,25 ml H <sub>2</sub> O 8,75 ml 10% APS 130 µl TEMED 14 µl

### 5.1.6. Aparatura, akcesoria i programy komputerowe

Aparat do elektroforezy agarozowej Agagel Midi Wide	Biometra, Niemcy
Aparat do elektroforezy białkowej Mini-PROTEAN®	Bio-Rad, USA
Czytnik płytek LUMIstar Omega	BMG Labtech, Niemcy
Czytnik płytek MR5000	Dynatech Laboratories, USA
DRG E-LizaMat X-2	DGR MedTek, Polska
Gel Doc XR+System	Bio-Rad, USA
Inkubator C 150	Binder, Niemcy
Jednorazowy sprzęt plastikowy: końcówki do pipet, płytki hodowlane, płytki polistyrenowe, szalki Petriego, probówki	Corning Inc., USA; Medlab, Niemcy; Starstedt, Niemcy; Eppendorf, Niemcy
Komora laminarna klasy II LabGard ES	NuAire, USA
Licznik komórek TC20	Bio-Rad, USA, USA
Mikroskop fluorescencyjny Axio Vert.A1	Carl Zeiss, Niemcy
Nanofotometr	IMPLEN, Niemcy
Pipety automatyczne	Eppendorf, Niemcy
Skanner podczerwieni Odyssey CLx	Li-Cor Biosciences, USA
Termocykler CFX-Connect	Bio-Rad, USA
Termocykler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Niemcy
Trans-Blot Turbo System	Bio-Rad, USA
Wirówka 1K15	Sigma Laborzentrifugen, Niemcy
Wirówka 5804 R	Eppendorf, Niemcy
Wirówka stołowa bez chłodzenia Mini Spin	Eppendorf, Niemcy
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, USA
Image Studio ver 2.0	Li-Cor Biosciences, USA
MS Office	Microsoft, USA

## 5.2. Metody

### 5.2.1. Hodowle komórkowe

Linie komórkowe stosowane w niniejszej pracy, warunki ich hodowli i pochodzenie zebrano w tabeli.

LINIA KOMÓRKOWA	POCHODZENIE	MEDIUM HODOWLANE
<b>A549-Dual</b>	Invivogen, San Diego, USA	DMEM+10% FBS, 1% Normocyna, Blastycydyna 10µg/ml, Zeocyna 100µg/ml
<b>A549-Dual KO-MDA5</b>	Invivogen, San Diego, USA	DMEM+10% FBS, 1% Normocyna, Blastycydyna 10µg/ml, Zeocyna 100µg/ml
<b>A549-Dula KO-RIG-I</b>	Invivogen, San Diego, USA	DMEM+10% FBS, 1% Normocyna, Blastycydyna 10µg/ml, Zeocyna 100µg/ml
<b>B16-Blue IFN-<math>\alpha/\beta</math></b>	Invivogen, San Diego, USA	RPMI+10% FBS, 1% Normocyna, Zeocyna 100µg/ml
<b>BMDM</b> (unieśmiertelnione mysie makrofagi pochodzenia szpikowego)	dzięki uprzejmości prof. Paul'a Moynagh z Uniwersytetu Maynooth	DMEM+10% FBS, 1% Normocyna
<b>BMDM <i>Mavs</i><sup>-/-</sup></b>	dzięki uprzejmości prof. Paul'a Moynagh z Uniwersytetu Maynooth	DMEM+10% FBS, 1% Normocyna
<b>BMDM <i>Peli3</i><sup>-/-</sup></b>	dzięki uprzejmości prof. Paul'a Moynagh z Uniwersytetu Maynooth	DMEM+10% FBS, 1% Normocyna
<b>HEK293</b> (ludzkie komórki embrionalne nerek)	ATCC	DMEM+10% FBS, 1% Normocyna

<b>LLC-Mk2</b> (komórki nerkowe, <i>Macaca mulatta</i> )	dzięki uprzejmości prof. Krzysztofa Pyrcia z Uniwersytetu Jagiellońskiego	DMEM+10% FBS, 1% Normocyna
<b>MDCK</b> (Komórki nerkowe <i>Canis familiaris</i> )	dzięki uprzejmości prof. Krzysztofa Pyrcia z Uniwersytetu Jagiellońskiego	DMEM+10% FBS, 1% Normocyna

Hodowla linii komórkowych prowadzona była w 5% atmosferze CO<sub>2</sub> w 37°C. Komórki stymulowano: wirusem paragrypy typu 3 (HPIV3 ang. human parainfluenza viruses), wirusem grypy typu A szczepu H3N2, ludzkim syncytialnym wirusem oddechowym (HRSV ang. human respiratory syncytial virus) oraz wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSIV) w ilości 1,5 MOI (ang. multiplicity of infection) przez 8 godzin (real-time PCR), 16 godzin (test BioAssay i ELISA) lub przez wskazany czas (Western Blot). Inhibitory FR180204 (2 µM) dodawano do komórek na godzinę przed dodatkiem wirusa.

### 5.2.2. Hodowla bakteryjna

GATUNEK	POCHODZENIE	WARUNKI HODOWLI
<i>Listeria monocytogenes</i>	Kolekcja IITD	Komórki hodowane były w pożywce LB w 37°C ze stałym wytrząsaniem 180 rpm.

Hodowla bakteryjna prowadzona była przez noc. Po tym czasie dokonywano pomiaru OD i wysiewano komórki na płytki ze stałą pożywką w celu ustaleniu OD odpowiadającemu 10 mln komórek bakteryjnych na ml ( $10 \times 10^6$  CFU/ml). Do zakażenia hodowli komórkowej używano bakterii w stosunku jedna komórka bakteryjna do jednej komórki eukariotycznej.

### 5.2.3. Namnażanie wirusów

WIRUS	POCHODZENIE	WARUNKI NAMNAŻANIA
<b>HPIV3 (wirus paragrypy typu 3)</b>	dzięki uprzejmości prof. Krzysztofa Pyrcia z Uniwersytetu Jagiellońskiego	Linia komórkowa LLC-Mk2; DMEM + 3% FBS, 1% Normocyna, trypsyna 1µg/ml; 37°C
<b>Wirus grypy typu A szczep H3N2</b>	dzięki uprzejmości prof. Krzysztofa Pyrcia z Uniwersytetu Jagiellońskiego	Linia komórkowa MDCK; DMEM + 3% FBS, 1% Normocyna, trypsyna 1µg/ml; 37°C
<b>HRSV (ludzki syncytialny wirus oddechowy)</b>	dzięki uprzejmości prof. Krzysztofa Pyrcia z Uniwersytetu Jagiellońskiego	Linia komórkowa LLC-Mk2; sole Hank's i Erle's w stosunku 2:1 + 3% FBS, 1% Normocyna; 32°C
<b>VSIV (wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej)</b>	ATCC	Linia komórkowa HEK293; DMEM + 10% FBS, 1% Normocyna; 37°C

Hodowla linii komórkowych prowadzona była w 5% atmosferze CO<sub>2</sub> w wymaganej przez wirusa temperaturze. Po zaobserwowaniu na hodowli komórkowej efektu cytopatycznego komórki mrożono w -80°C, w celu uwolnienia jak największej ilości cząsteczek wirusa, a następnie zbierano lizat i wirowano przez 15 minut przy 15000 x g w 4°C. Uzyskany nadsącz zbierano, rozpipetowano po 100 µl i mrożono w -80°C. W uzyskanych w ten sposób porcjach wirusa oznaczano PFU (ang. plaque forming units).

### 5.2.4. Oznaczanie miana wirusów

Miano wirusów używanych do zakażenia komórek oznaczano poprzez miareczkowanie z wykorzystaniem metody łyśinkowej na 24-godzinnej, jednowarstwowej hodowli HEK293 dla VSIV, LLC-Mk2 dla HPIV3 i HRSV oraz MDCK dla wirusa grypy typu A, na 6-dołkowych płytkach. W osobnych próbkach przygotowano rozcieńczenia wirusa w postępie logarytmicznym (od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-9</sup>). Z każdego dołka usunięto za pomocą pipety 1 ml płynu hodowlanego. Rozcieńczenia

wirusa w ilości 100 µl przenoszono pipetą na płytkę z hodowlą w dwóch powtórzeniach, a następnie inkubowano 1,5 godziny w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubacji ostrożnie usunięto medium ze studzienek. Następnie dodano do każdej studzienki 2 ml mieszaniny: 2-krotnie stężonego DMEM z 4% FBS, PBS i 2% sterylnego roztworu agarozy (w stosunku 1: 0,3: 0,7 objętości). Płytki pozostawiono w temperaturze pokojowej na 15 minut, po czym inkubowano 3 dni w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, do pojawienia się wyraźnych przejaśnień w hodowli, tzw. „łysinek”. „Łysinki” w hodowli w formie wyraźnych kół obserwowano pod mikroskopem odwróconym. Stężenie zawiesiny wirusa obliczano wg wzoru:

$$\text{miano wirusa [PFU/ml]} = (\text{ilość łysinek} * 10) / \text{rozcieńczenie zawiesiny wirusa.}$$

## **5.2.5. Analiza ekspresji genów**

### ***5.2.5.1. Izolacja całkowitego RNA***

Całkowite RNA izolowano z 1,5 mln komórek z wykorzystaniem odczynnika PureZol (Bio-Rad), postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki lizowano używając 0,5 ml PureZolu, następnie dodano 0,1 ml chloroformu i wytrząsano przez 15 sekund. Mieszaninę inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano 15 minut przy 15000 x g w 4°C. Po wirowaniu zbierano górną fazę wodną do świeżej próbówki i dodawano równą objętość alkoholu izopropylowego. Po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej mieszaninę wirowano 15 minut przy 15000 x g w 4°C. Następnie zbierano supernatant, a powstały pelet przemywano dwukrotnie 75% etanolem i wirowano 5 minut przy 7500 x g w 4°C. Uzyskany pelet suszono i zawieszano w wodzie wolnej od nukleaz. Pomiaru stężenia kwasu nukleinowego dokonywano spektrofotometrycznie z wykorzystaniem aparatu NanoPhotometer®P 360 (IMPLEN). Czystość wyizolowanego materiału oceniano na podstawie stosunków absorbancji odczytanej przy długości fali λ=260, λ=280 i λ=230 nm.

#### **5.2.5.2. Degradacja genomowego DNA**

1 µg całkowitego RNA oczyszczano z zanieczyszczeń pochodzących z genomowego DNA poprzez trawienie deoksyrybonukleazą I. Mieszaninę reakcyjną (10 µl) inkubowano przez 30 minut w 37°C. Reakcję przerywano poprzez dodanie do mieszaniny 50 mM EDTA (1 µl) i ogrzewanie próbki przez 10 minut w temperaturze 65°C.

#### **5.2.5.3. Odwrotna transkrypcja (RT-PCR)**

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono z użyciem zestawu iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR. 1 µg matrycy (izolacja opisana w punkcie 5.2.5.1.) dodawano do 4 µl iScript RT Supermix i dopełniano do 20 µl wodą wolną od nukleaz. Próbkę inkubowano kolejno: 5 minut w 25°C, 20 minut w 37°C, 20 minut w 46°C oraz 1 minutę w 96°C. Po zakończeniu reakcji do mieszaniny dodawano 20 µl wody wolnej od nukleaz. Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

#### **5.2.5.4. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR)**

Reakcja real-time PCR prowadzona była w aparacie CFX Connect (Bio-Rad). Do reakcji używano 10 ng cDNA. Objętość prób zawierających cDNA uzupełniano do 10 µl o odpowiednie startery (w stężeniu końcowym 0,4 µM każdy) oraz iTaq Uniwersal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Każdy punkt pomiarowy wykonywano w dwóch powtórzeniach. Zastosowano następujące warunki reakcji: aktywacja polimerazy (30 sekund, 95°C), denaturacja matrycy (10 sekund, 95°C), hybrydyzacja starterów (15 sekund, 60°C), elongacja (15 sekund, 72°C). Reakcję prowadzono przez 40 cykli. Wyniki normalizowano względem endogennej kontroli genu fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (HPRT) i analizowano z zastosowaniem metody  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Kontrolę specyficzności stosowanych starterów stanowiły krzywe topnienia produktów.



### **5.2.5.5. Reakcja PCR**

Reakcję PCR prowadzono z wykorzystaniem polizmerazy DNA RedTaq (Sigma) zgodnie z zaleceniami producenta. Mieszanina reakcyjna zawierała 3,5  $\mu$ l cDNA otrzymanego w reakcji RT (co odpowiadało około 70 ng kwasu nukleinowego), 2,5  $\mu$ l 10x buforu do reakcji, 200  $\mu$ M dNTP, 0,5  $\mu$ M startera F i 0,5  $\mu$ M startera R. Całość uzupełniano wodą wolną od nukleaz do końcowej objętości 25  $\mu$ l. Po wstępnej denaturacji matrycy w 95°C przez 3 minuty zastosowano 40 cykli obejmujących: denaturację w 95°C (30 sekund), hybrydyzację w temperaturze 60°C (60 sekund) oraz wydłużanie w temperaturze 72°C (60 sekund). Końcowe wydłużanie ampliconu prowadzono przez 5 minut w temperaturze 72°C. Produkt PCR rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym w buforze TAE z dodatkiem Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe GmbH). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w aparacie Agagel Midi-Wide (Biometra) przy napięciu 12 V/cm, stosując TAE jako bufor elektrodowy. Po rozdzieleniu obraz żelu analizowano w aparacie Gel Doc XR+System.

### **5.2.6. Oznaczanie poziomu biologicznie aktywnych interferonów typu I (Bioassay)**

Poziom biologicznie aktywnych interferonów typu I oznaczano metodą biologiczną (Bioassay) z użyciem linii komórkowej B16-Blue IFN- $\alpha/\beta$  (Invivogen). Oznaczenie wykonywano zgodnie z instrukcją producenta. Komórki BMDM wysiewano na płytki hodowlane w gęstości 0,5 x 10<sup>6</sup>/ml medium hodowlanego. Następnego dnia komórki stymulowano wirusem. Komórki B16-Blue IFN- $\alpha/\beta$  wysiewano w gęstości 4,2 x 10<sup>5</sup>/ml medium hodowlanego i dodawano po 20  $\mu$ l nadsącza znad stymulowanych przez 16 godzin komórek BMDM, następnie inkubowano przez kolejne 16 godzin. Jako kontrolę pozytywną testu użyto 20  $\mu$ l poly(I:C) o stężeniu 10  $\mu$ g/ml. Kontrolę negatywną testu stanowiło 20  $\mu$ l medium DMEM. Po inkubacji, 20  $\mu$ l nadsącza znad komórek B16-Blue IFN- $\alpha/\beta$  dodawano do 180  $\mu$ l medium QUANTI-Blue (Invivogen) naniesionego na 96-dółkową płytkę testową. Po 3 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C w próbach oznaczano poziom biologicznie aktywnych interferonów typu I poprzez pomiar absorbancji przy długości fali  $\lambda=630$  nm.

### **5.2.7. Oznaczenie poziomu cytokin (IP-10 oraz TNF $\alpha$ )**

Poziom wydzielanych cytokin TNF $\alpha$  oraz IP-10 oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA. Komórki BMDM wysiewano na płytkę hodowlaną w gęstości  $0,5 \times 10^6$ /ml medium hodowlanego. Następnego dnia infekowano je VSIV przez 16 godzin. Kontrolę negatywną testu stanowiło medium DMEM. Pomiar poziomu cytokin w supernatancie pohodowlanym wykonano zgodnie z zaleceniami producenta zestawów (R&D) z wykorzystaniem zautomatyzowanego systemu pipetującego DRG E-LizaMat X-2 (firmy DGR MedTek). Płytkę polistyrenową opłaszczano przeciwciałami pierwszorzędowymi w stężeniu  $1 \mu\text{g/ml}$  w PBS i inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej. Po czterokrotnym przepłukaniu płytki PBS blokowano miejsca nieswoiście wiążące immunoglobuliny za pomocą roztworu blokującego przez 1 godzinę w  $37^\circ\text{C}$ . Płytkę ponownie płukano, a następnie наносzono rekombinowane białko TNF $\alpha$  lub IP-10 w określonych stężeniach oraz nadsącze znad komórek BMDM w ilości  $100 \mu\text{l}$ /dołek i inkubowano przez godzinę w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Po ponownym płukaniu płytki наносzono  $100 \mu\text{l}$  biotynylowanych przeciwciał o stężeniu  $0,5 \mu\text{g/ml}$  w PBS i inkubowano przez kolejną godzinę w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Po odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał dodawano koniugat awidyna-HRP (1:2000 v/v). Detekcję prowadzono z użyciem substratu TMB odczytując absorbancję przy długości fali  $\lambda=450$  nm. Stężenie TNF $\alpha$  oraz IP-10 w badanych próbach odczytano z krzywej standardowej.

### **5.2.8. Oznaczenie poziomu aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF**

Poziom aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF oznaczano z użyciem linii komórkowych A549-DUAL, A549-DUAL KO-MDA5 oraz A549-Dual KO-RIG-I (Invivogen). Komórki te ekspresjonują gen kodujący lucyferazę pod kontrolą promotora aktywowanego przez czynniki transkrypcyjne z rodziny IRF. Komórki po infekcji wirusowej lub stymulacji ligandem rozpoznawanym przez receptory z rodziny RLR produkują lucyferazę, która wydzielana jest do medium hodowlanego. Poziom produkcji lucyferazy mierzono z wykorzystaniem substratu QUANTI-Luc. Oznaczenie wykonywano zgodnie z instrukcją producenta. Komórki A549-DUA wysiewano na płytki

hodowlane w gęstości  $2,8 \times 10^5$ /ml medium hodowlanego. Następnego dnia komórki stymulowano wirusem VSIV przez 16 godzin. Jako kontrolę pozytywną testu użyto 20  $\mu$ l poly(I:C) o stężeniu 10  $\mu$ g/ml. Kontrolę negatywną testu stanowiło 20  $\mu$ l medium DMEM. Odczytu dokonywano na 96-dołkowej nieprzezroczystej płytce testowej w mieszaninie: 20  $\mu$ l nadsącza znad komórek A549-DUAL oraz 180  $\mu$ l QUANTI-Luc i natychmiast przeprowadzono pomiar luminescencji na czytniku płytek LUMIstar Omega (BMG Labtech).

### **5.2.9. Oznaczanie ilości białka metodą Bradforda**

Stężenie białka w badanych preparatach oznaczano metodą Bradforda z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Pierce Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit. Test przeprowadzano na płytkach 96-dołkowych. Do próbek o objętości 5  $\mu$ l dodawano 245  $\mu$ l odczynnika Bradford. Płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut, a następnie dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali  $\lambda=595$ nm przy pomocy czytnika MR5000 (Dynatech Laboratories). Stężenie białka w badanej próbce wyznaczano na podstawie krzywej kalibracyjnej wykonanej z wykorzystaniem wzorców białkowych.

### **5.2.10. SDS-PAGE i Western blot**

#### ***5.2.10.1. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym***

Komórki wysiewano na płytki hodowlane w gęstości 2 mln/ml medium hodowlanego i infekowano wirusem, a następnie poddawano lizie w buforze HS. Elektroforetyczny rozdział białek przeprowadzano w żelu poliakrylamidowym według Laemmli'ego w warunkach denaturujących (118). Lizaty komórek zawierające 10-50  $\mu$ g białka mieszano z buforem do nanoszenia próbek (w stosunku 3:1) i denaturowano przez 10 minut w temperaturze 95°C. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej próbki nanoszono na 12% żel poliakrylamidowy i poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu w aparacie Mini-PROTEAN (BioRad) przy napięciu 90 V do momentu odpowiedniego zagęszczenia próbek w żelu zagęszczającym, następnie rozdział był kontynuowany przy napięciu 120 V.

### **5.2.10.2. Elektrotransfer białek**

Po rozdzielaniu elektrofoterycznym białka przenoszono z żelu na membrany nitrocelulozowe (0,45  $\mu\text{m}$ ). Elektrotransfer prowadzono przez 30 minut w aparacie Trans-Blot Turbo System (BioRad) przy napięciu 25 V i natężeniu 1A.

### **5.2.10.3. Detekcja białek immobilizowanych na membranie nitrocelulozowej**

W celu zablokowania oddziaływań niespecyficznych pomiędzy nitrocelulozą a przeciwciałami membrany inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej w 1% roztworze kazeiny w TBS-T. Po tym czasie nitrocelulozę płukano z wykorzystaniem buforów TBS-T i TBS. Następnie membrany inkubowano w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych w TBS-T przez 16 godzin w 4°C. Powtarzano procedurę płukania i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym w TBS-T przez godzinę w temperaturze pokojowej. Membrany ponownie płukano. Wynik odczytywano przy pomocy skanera podczerwieni ODYSSEY Infrared Imaging System (LiCor). Przeciwciała pierwszorzędowe i drugorzędowe rozcieńczano w 1% roztworze kazeiny w TBS-T według wskazań producenta.

### **5.2.12. Analiza statystyczna**

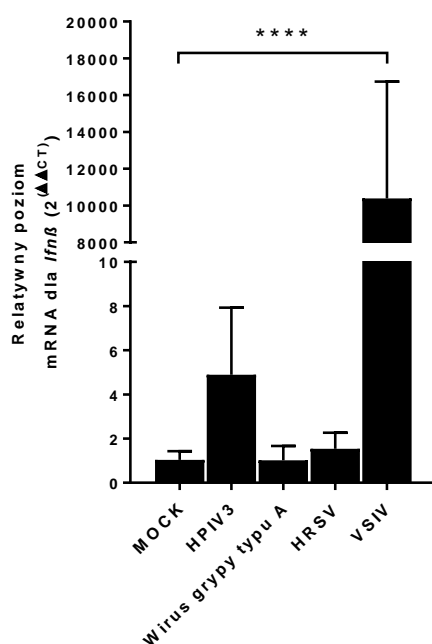
Wyniki przedstawione w pracy wyrażone są jako średnie arytmetyczne  $\pm$  odchylenie standardowe, z trzech niezależnych powtórzeń. Różnice między dwoma badanymi grupami oceniano za pomocą testu t-Studenta przyjmując za istotne statystycznie wartości  $p < 0,05$ . Wartości  $p$  kolejno oznaczono  $p < 0,05$  - \*,  $p < 0,01$  - \*\*,  $p < 0,001$  - \*\*\*,  $p < 0,0001$  - \*\*\*\*. Analizę statystyczną oraz graficzne przedstawienie wyników wykonano za pomocą programu GraphPad Prism 7.

## 6. Wyniki

### 6.1. Badanie indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej w komórkach BMDM

#### 6.1.1. Analiza ekspresji genu *Ifn $\beta$* po stymulacji wybranymi wirusami

W celu określenia, który wirus zdolny jest do aktywacji odpowiedzi przeciwwirusowej w unieśmiertelnionych mysich makrofagach pochodzenia szpikowego BMDM infekowano je wirusem grypy rzekomej typu 3 (ang. Human parainfluenza virus, HPIV3), wirusem grypy typu A szczep H3N2 (ang. Influenza A virus), syncytialnym wirusem oddechowym (ang. Human respiratory syncytial virus, HRSV) oraz wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (ang. Indiana vesiculovirus, VSIV). Następnie metodą real-time PCR określono zmiany w ekspresji genu kodującego interferon  $\beta$ .



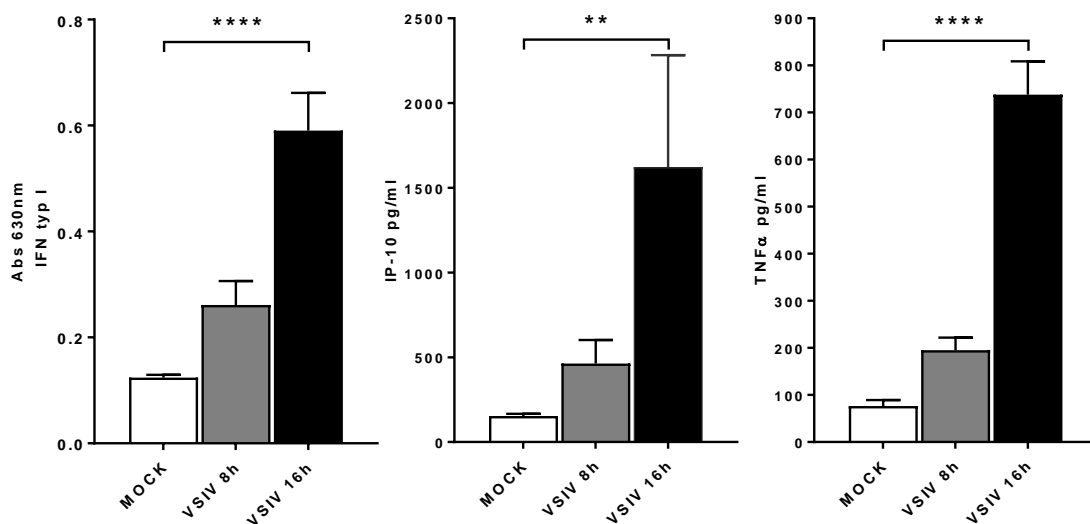
**Rys. 6.1.1. Poziom ekspresji genu *Ifn $\beta$*  w komórkach BMDM WT w odpowiedzi na infekcję wirusową.** Komórki infekowano wirusami (HPIV3, H3N2, HRSV-oraz VSIV) w ilości 1,5 MOI przez 8 godzin. Kontrolę stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszono były wirusy (MOCK). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą real-time

PCR oznaczano relatywny poziom ekspresji genu *Ifnβ*. Jako genu referencyjnego użyto *Hprt1*.  
\*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Wykazano, że w komórkach BMDM dochodzi do znacznego wzrostu ekspresji genu kodującego IFN $\beta$  jedynie w odpowiedzi na wirus VSIV (Rys. 6.1.1.). W związku z tym został on wytypowany do dalszych badań.

## 6.1.2. Analiza poziomu produkcji białek efektorowych przez komórki BMDM

W celu ustalenia optymalnego punktu czasowego do analizy poziomu produkcji interferonów typu I oraz cytokin prozapalnych, medium z nad komórek BMDM zinfekowanych wirusem VSIV zbierane było w dwóch punktach czasowych 8 i 16 godzin po infekcji. Następnie poziom interferonów typu I znajdujących się w nadsączu mierzono metodą testu biologicznego BioAssay. Poziom cytokin TNF $\alpha$  oraz IP-10 mierzony był z wykorzystaniem testów ELISA.

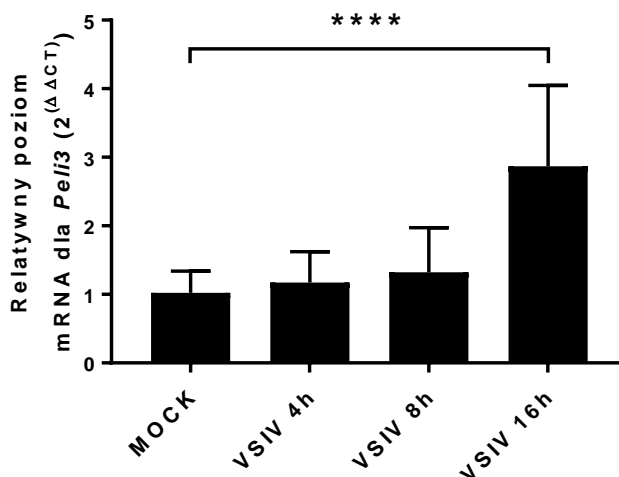


**Rys. 6.1.2** Poziom produkcji interferonów typu I, IP-10 oraz TNF $\alpha$  w komórkach BMDM WT po infekcji VSIV. Komórki infekowano VSIV przez 8 i 16 godzin. Kontrolę stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznego z tym, w którym zawieszono wirusy (MOCK). Poziom wydzielonych białek analizowano metodą BioAssay (interferony typu I) oraz ELISA (IP-10, TNF $\alpha$ ). \*\*\*\*  $p < 0,0001$  \*\* $p < 0,01$ .

Wykazano, że produkcja biologicznie aktywnych interferonów typu I, TNF $\alpha$  oraz IP-10 przez komórki BMDM infekowane VSIV widoczna jest na niskim poziomie już 8 godzin po infekcji. Jednakże po 16 godzinach infekcji wirusowej poziom produkcji badanych białek wzrasta kilkukrotnie (Rys. 6.1.2.). Dlatego do dalszych badań nad odpowiedzią komórkową na VSIV, metodą testów biologicznych, wybrany został szesnastogodzinny czas inkubacji.

### 6.1.3. Analiza ekspresji genu *Peli3* po stymulacji wirusem VSIV

W celu określenia poziomu ekspresji genu kodującego białko Pellino3 w komórkach BMDM infekowano je wirusem VSIV przez 4, 8 i 16 godzin. Następnie metodą real-time PCR określono zmiany w ekspresji genu *Peli3*.



**Rys. 6.1.3. Poziom ekspresji genu *Peli3* w komórkach BMDM WT w odpowiedzi na infekcję wirusową.** Komórki infekowano wirusem VSIV w ilości 1,5 MOI przez 4, 8 oraz 16 godzin. Kontrolę stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszono były wirusy (MOCK). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą real-time PCR oznaczano relatywny poziom ekspresji genu *Peli3*. Jako genu referencyjnego użyto *Hprt1*. \*\*\*\* p<0,0001.

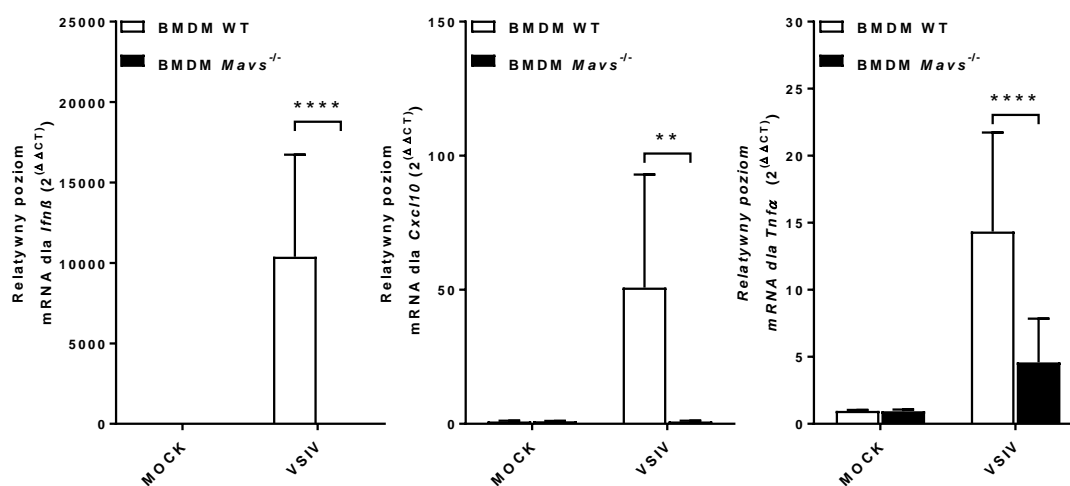
Analiza wykazała, że w pierwszych ośmiu godzinach po infekcji wirusowej gen *Peli3* ulega ekspresji na poziomie porównywalnym z tym obserwowanym w komórkach nieinfekowanych. Jednakże w szesnastej godzinie po infekcji wirusowej zaobserwowano istotny wzrost syntezy mRNA dla białka Pellino3 (Rys. 6.1.3.). Obserwowane wyniki

wskazują na to, że gen *Peli3* w trakcie infekcji wirusowej ulega zwiększonej ekspresji w późnych etapach odpowiedzi przeciwwirusowej.

## 6.2. Rola receptorów z rodziny RLR w odpowiedzi przeciwwirusowej indukowanej po infekcji VSIV

### 6.2.1. Analiza ekspresji genów efektorowych w komórkach BMDM *Mavs*<sup>-/-</sup> po stymulacji wirusem VSIV

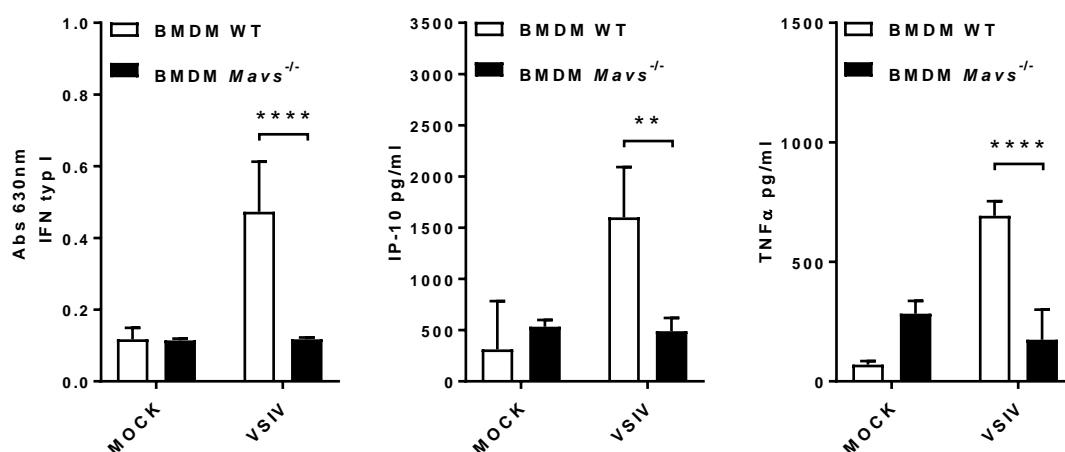
W celu sprawdzenia czy VSIV rozpoznawany jest przez receptory z rodziny RLR wykorzystano komórki BMDM z nokautem genu kodującego białko MAVS (BMDM *Mavs*<sup>-/-</sup>), które jest jedynym adaptorem sygnału pochodzącego od receptorów RLR. Komórki (BMDM WT oraz BMDM *Mavs*<sup>-/-</sup>) infekowano wirusem VSIV, a następnie metodą real-time PCR określono poziom ekspresji genów *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa*.



**Rys. 6.2.1. Poziom ekspresji genu *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa* w komórkach BMDM w odpowiedzi na infekcję wirusową.** Komórki infekowano VSIV w ilości 1,5 MOI przez 8 godzin. Kontrolę stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszony był wirus (MOCK). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą real-time PCR oznaczano relatywny poziom ekspresji genu *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa*. Jako genu referencyjnego użyto *Hprt1*. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ .



W komórkach BMDM *Mavs*<sup>-/-</sup> po infekcji VSIV nie zaobserwowano ekspresji genów kodujących IFN $\beta$  oraz IP-10 (Rys. 6.2.1.). Natomiast ekspresja mRNA dla TNF $\alpha$  jest obserwowana na trzykrotnie niższym poziomie w porównaniu do komórek typu dzikiego. W kolejnym etapie sprawdzono czy dane uzyskane na poziomie transkryptu korelują z poziomem wydzielonych białek. Do pomiaru biologicznie aktywnych interferonów typu I zastosowano BioAssay, natomiast poziom IP-10 i TNF $\alpha$  oznaczano testem ELISA.



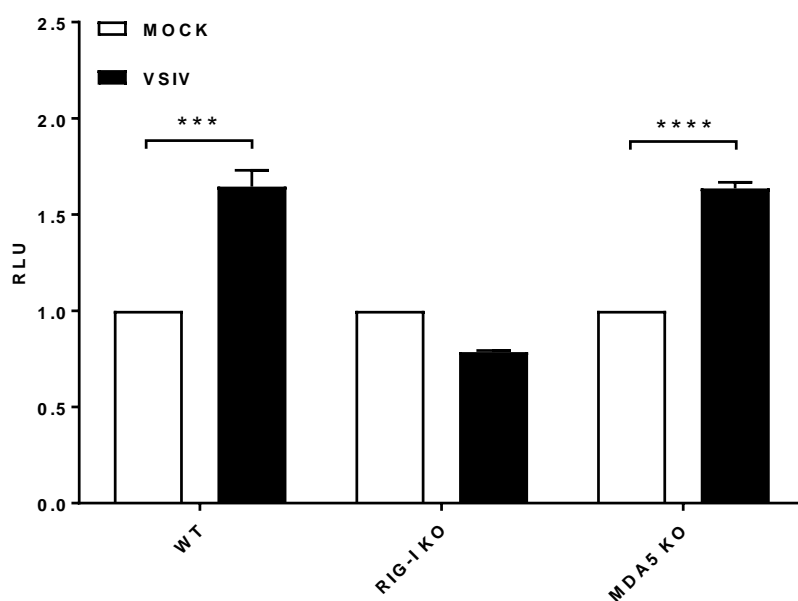
**Rys. 6.2.2. Poziom produkcji interferonów typu I oraz cytokin TNF $\alpha$  i IP-10 w komórkach BMDM w odpowiedzi na infekcję wirusową.** Komórki infekowano VSIV w ilości 1,5 MOI przez 16 godzin. Kontrolę stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznego z tym, w którym zawieszono wirusy (MOCK). Poziom wydzielonych białek analizowano metodą BioAssay (interferony typu I) oraz ELISA (IP-10, TNF $\alpha$ ). \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,001$ .

Otrzymane wyniki pokazują, że komórki BMDM *Mavs*<sup>-/-</sup> nie produkują zwiększonej ilości biologicznie aktywnych interferonów typu I oraz cytokin prozapalnych po infekcji VSIV (Rys. 6.2.2.). Uzyskane wyniki świadczą o tym, że receptory z rodziny RLR są odpowiedzialne za indukcję odpowiedzi przeciwwirusowej zależnej od VSIV.

### 6.2.2. Analiza aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF w komórkach A549 po stymulacji wirusem VSIV

W celu określenia, który z receptorów rodziny RLR odpowiedzialny jest za rozpoznanie wirusa VSIV wykorzystano komórki A549-Dual, A549-Dual KO-RIG-I oraz A549-Dual KO-MDA5. Komórki te ekspresjonują dodatkowo gen kodujący

lucyferazę pod kontrolą promotorów aktywowanych przez czynniki transkrypcyjne z rodziny IRF. Poziom produkcji lucyferazy po rozpoznaniu przez komórki liganda skorelowany jest z poziomem odpowiedzi przeciwwirusowej indukowanej przez receptory z rodziny RLR. Komórki infekowane były wirusem VSIV przez 16 godzin. Następnie zebrany nadsącz komórkowy poddawano analizie metodą QUANTI-LUC.



**Rys. 6.2.3. Aktywacja czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową.** Komórki infekowano VSIV w ilości 1,5 MOI przez 16 godzin. Kontrolę stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszono wirusy (MOCK). Uzyskany nadsącz komórkowy analizowano metodą QUANTI-LUC. \*\*\*\*p <0,0001, \*\*\*p <0,001.

Wykazano, że zarówno w komórkach A549 WT, jak i w komórkach z inaktywowanym genem kodującym receptor MDA-5 dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF w odpowiedzi na infekcję wirusem VSIV. Podobnego efektu nie zaobserwowano natomiast w komórkach A549 z nokautem w genie kodującym receptor RIG-I (Rys. 6.2.3.), potwierdzając tym samym udział receptora RIG-I w odpowiedzi przeciwwirusowej aktywowanej VSIV.

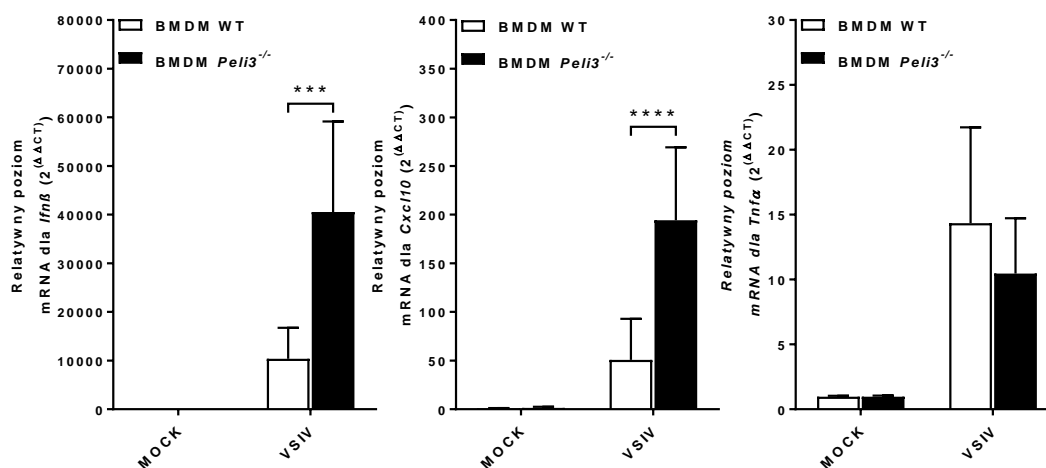
Genom wirusa VSIV składa się z ujemnie spolaryzowanego jednoniciowego RNA i jest rozpoznawany przez receptor RIG-I. Podobne cząsteczki kwasów nukleinowych rozpoznawane są w komórce przez receptor TLR3. Wcześniejsze badania wskazują na to, że białko Pellino3 zdolne jest do regulacji szlaków sygnałowych aktywowanych po

rozpoznaniu przez TLR3 cząsteczki RNA, dlatego w dalszym etapie badań postanowiono sprawdzić wpływ Pellino3 na ścieżki sygnałowe aktywowane przez receptor RIG-I.

### 6.3. Rola białka Pellino3 w szlaku sygnałowym zależnym od receptorów z rodziny RLR

#### 6.3.1. Analiza ekspresji genów efektorowych w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> po stymulacji wirusem VSIV

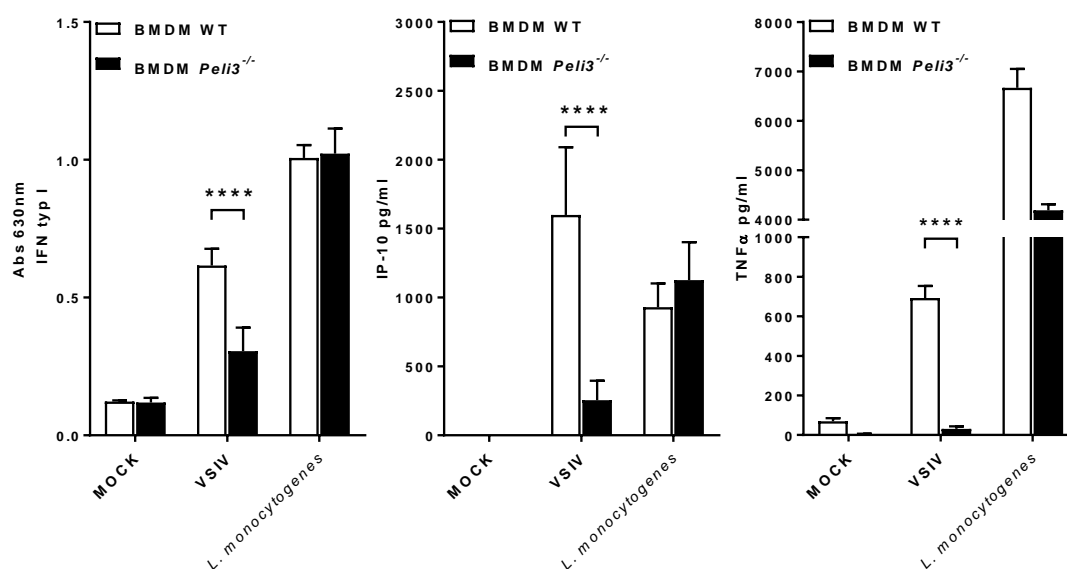
Aby określić rolę białka Pellino3 w odpowiedzi przeciwwirusowej, komórki typu dzikiego (BMDM WT) oraz z nokautem białka Pellino3 (BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup>) infekowano wirusem VSIV przez 8 godzin. Następnie metodą real-time PCR określano zmiany w ekspresji genów *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa* zachodzące w odpowiedzi na stymulację wirusem.



**Rys. 6.3.1. Poziom ekspresji genu *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa* w komórkach BMDM w odpowiedzi na infekcję wirusową.** Komórki infekowano VSIV w ilości 1,5 MOI przez 8 godzin. Kontrolę stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznego z tym, w którym zawieszono wirusy (MOCK). Następnie z komórek izolowano całkowite RNA, przepisywano na cDNA i metodą real-time PCR oznaczano relatywny poziom ekspresji genu *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa*. Jako genu referencyjnego użyto *Hprt1*. \*\*\*\*p < 0,0001, \*\*\*p < 0,001.

Wykazano, że w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> infekowanych VSIV poziom ekspresji genów kodujących zarówno IFN $\beta$ , jak i IP-10 wzrasta czterokrotnie w porównaniu z komórkami typu dzikiego. Nie zmienia się natomiast poziom ekspresji genu kodującego TNF $\alpha$  (Rys. 6.3.1.).

Dodatkowo sprawdzono czy zmiany w ekspresji badanych genów obserwowane na poziomie mRNA widoczne są również na poziomie białek. W tym celu komórki BMDM WT oraz BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> infekowano wirusem VSIV przez 16 godzin. Następnie oznaczano poziom aktywnych biologicznie interferonów typu I (BioAssay) oraz cytokin prozapalnych (ELISA). Kontrolę pozytywną stanowiły komórki BMDM stymulowane żywymi bakteriami z gatunku *L. monocytogenes* w ilości 1,5 komórki bakteryjnej na 1 komórkę BMDM.



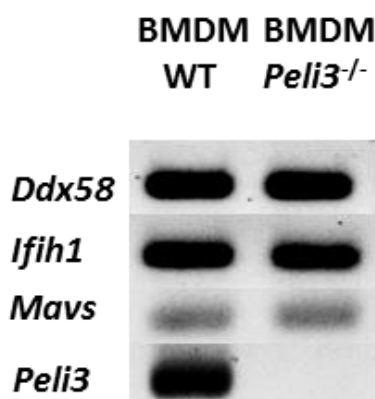
**Rys. 6.3.2. Poziom produkcji interferonów typu I oraz cytokin TNF $\alpha$  i IP-10 w komórkach BMDM w odpowiedzi na infekcję wirusową.** Komórki infekowano VSIV w ilości 1,5 MOI przez 16 godzin. Kontrolę stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszono były wirusy (MOCK). Hodowle inkubowano przez 16 h. Następnie zbierano nadsącz komórkowy, w którym analizowano poziom wydzielonych białek metodą biologiczną BioAssay (interferony typu I) oraz ELISA (IP-10, TNF $\alpha$ ). \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Otrzymane wyniki wskazują, że komórki z nokautem genu kodującego Pellino3 charakteryzują się znacząco obniżonym poziomem produkcji cytokin prozapalnych oraz interferonów typu I w odpowiedzi na infekcję wirusową (Rys. 6.3.2.). Wykazano również, że poziom produkcji IP-10 oraz interferonu typu I w komórkach BMDM

*Peli3*<sup>-/-</sup> zakażonych *L. monocytogenes* jest niezmienny oraz że poziom produkcji TNF $\alpha$  w tych komórkach jest obniżony prawie dwukrotnie (Rys. 6.2.2.).

### 6.3.2. Badanie fenotypu linii komórkowej BMDM typu dzikiego i *Peli3*<sup>-/-</sup>

W kolejnym etapie sprawdzono czy nokaut genu dla ligazy Pellino3 wpływa na poziom ekspresji genów kodujących RIG-I, MDA-5 oraz MAVS odpowiednio *Ddx58*, *Ifih1* oraz *Mavs*. Miało to potwierdzić, czy obserwowane zmiany w ekspresji i produkcji interferonu typu I po infekcji wirusowej zależą jedynie od ekspresji genu kodującego Pellino3 w komórce. W tym celu przeprowadzono analizę ekspresji genów *Ddx58*, *Ifih1*, *Mavs* oraz *Peli3* w komórkach BMDM typu dzikiego oraz *Peli3*<sup>-/-</sup>.

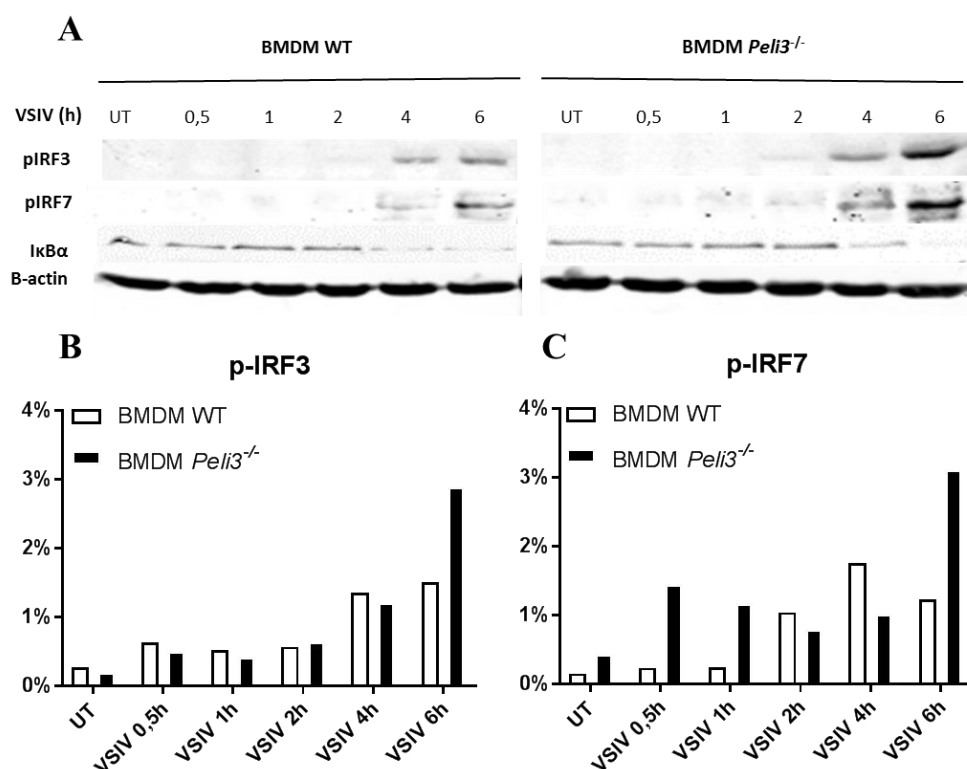


**Rys. 6.3.3. Analiza ekspresji genów *Ddx58*, *Ifih1*, *Mavs* oraz *Peli3* w BMDM WT oraz BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup>.** Z komórek BMDM WT oraz *Peli3*<sup>-/-</sup> izolowano całkowite RNA i przepisano na cDNA. Następnie uzyskane cDNA wykorzystano jako matrycę do amplifikacji określonych fragmentów w klasycznej reakcji PCR. Amplikony poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 1% żelu agarozowym i wizualizowano z użyciem interkalatora Midori Green.

Zaobserwowano, że nokaut *Peli3* w komórkach BMDM nie wpływa na poziom ekspresji genów zarówno dla receptorów RIG-I oraz MDA-5, jak również białka MAVS. Jednocześnie potwierdzono, że w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> nie zachodzi ekspresja genu kodującego białko Pellino3 (Rys. 6.3.3.). Można zatem wnioskować, że zahamowanie wydzielania cytokin jest efektem braku ekspresji ligazy.

## 6.4. Badanie roli białka Pellino3 w aktywacji wybranych czynników transkrypcyjnych w komórkach BMDM po infekcji VSIV

W celu określenia udziału białka Pellino3 w aktywacji wybranych czynników transkrypcyjnych w komórkach BMDM infekowanych VSIV zbadano poziom fosforylacji IRF3 oraz IRF7 oraz stopień degradacji podjednostki inhibitorowej czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B – I $\kappa$ B $\alpha$  (ang. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha). Degradacja czynnika I $\kappa$ B $\alpha$  jest charakterystyczna dla kanonicznej ścieżki aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. Zmiany poziomu badanych białek analizowano techniką western blot i skorelowano z całkowitą ilością białka w komórce reprezentowaną przez ilość  $\beta$ -aktyny w lizatach komórkowych.

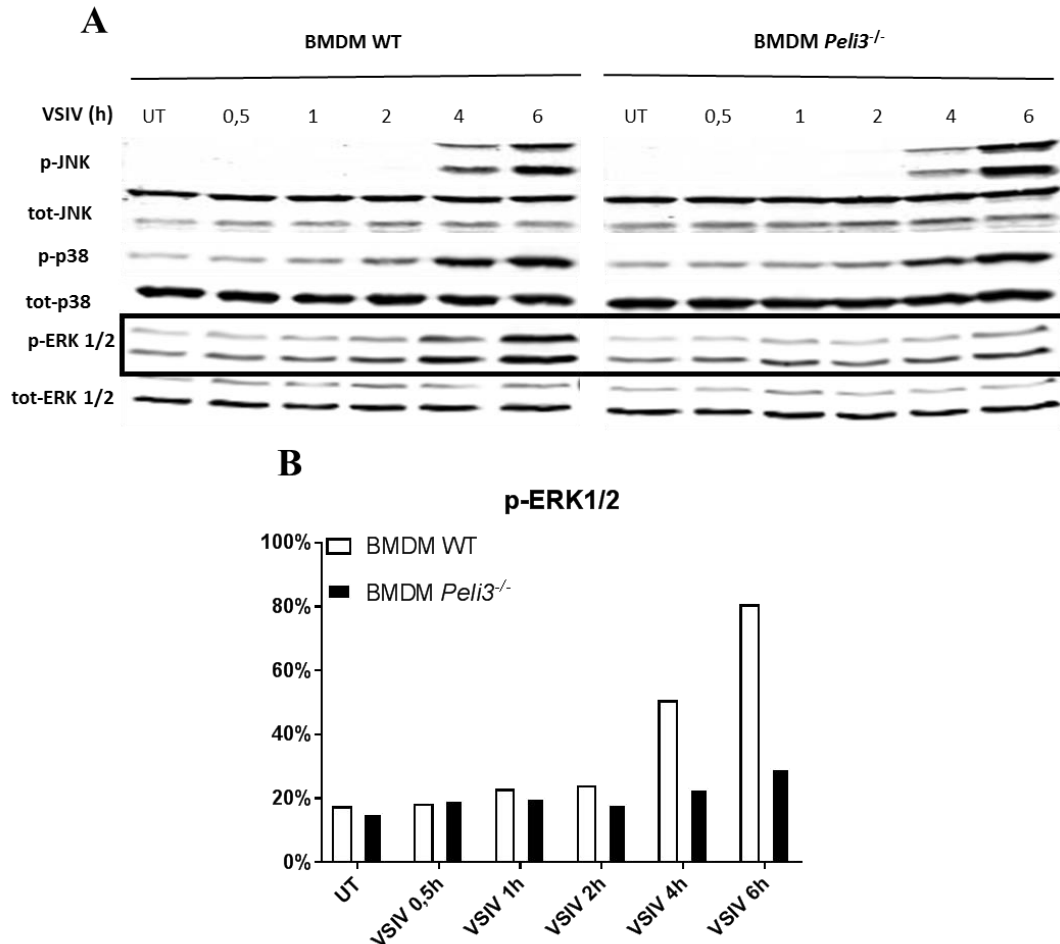


**Rys. 6.4.** Analiza aktywacji czynników transkrypcyjnych w komórkach BMDM po infekcji wirusem VSIV. Komórki infekowano VSIV w ilości 1,5 MOI we wskazanych punktach czasowych. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję prowadzono z użyciem przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem w aparacie Odyssey CLx. Analizę densytometryczną przeprowadzono z użyciem programu Image Studio ver 2.0. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.

Uzyskane wyniki wykazały, że podczas infekcji komórek BMDM wirusem VSIV dochodzi do degradacji białka IκBα w takim samym stopniu w komórkach dzikich, jak i *Peli3*<sup>-/-</sup> (Rys 6.4. A). Pokazano, że zarówno w komórkach dzikich, jak i z delecją w genie kodującym białko Pellino3 dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych IRF3 oraz IRF7 (Rys 6.4. A). Dodatkowo analiza densytometryczna wykazała, że brak białka Pellino3 w komórkach BMDM skutkuje podwyższonym poziomem fosforylacji tych czynników w porównaniu do komórek typu dzikiego (Rys 6.4. B, C).

## **6.5. Badanie roli białka Pellino3 w aktywacji wybranych MAP kinaz w komórkach BMDM po infekcji VSIV**

Wpływ białka Pellino3 na aktywację wybranych MAP kinaz po infekcji wirusowej badano techniką western blot. Wykorzystano przeciwciała skierowane przeciwko ufosforylowanym formom kinaz białkowych: ERK1/2 (p-ERK1/2), p38 (p-p38) oraz JNK (p-JNK). Poziom fosforylowanych form badanych białek skorelowano z całkowitą ilością kinaz ERK1/2 (tot-ERK1/2), p38 (tot-p38) oraz JNK (tot-JNK).



**Rys. 6.5. Kinetyka aktywacji MAP kinaz w komórkach BMDM po infekcji wirusem VSIV.** Komórki infekowano VSIV w ilości 1,5 MOI. Lizaty izolowano w wybranych punktach czasowych, rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję prowadzono z użyciem przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem w aparacie Odyssey CLx. Analizę densytometryczną przeprowadzono z użyciem programu Image Studio ver 2.0. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.

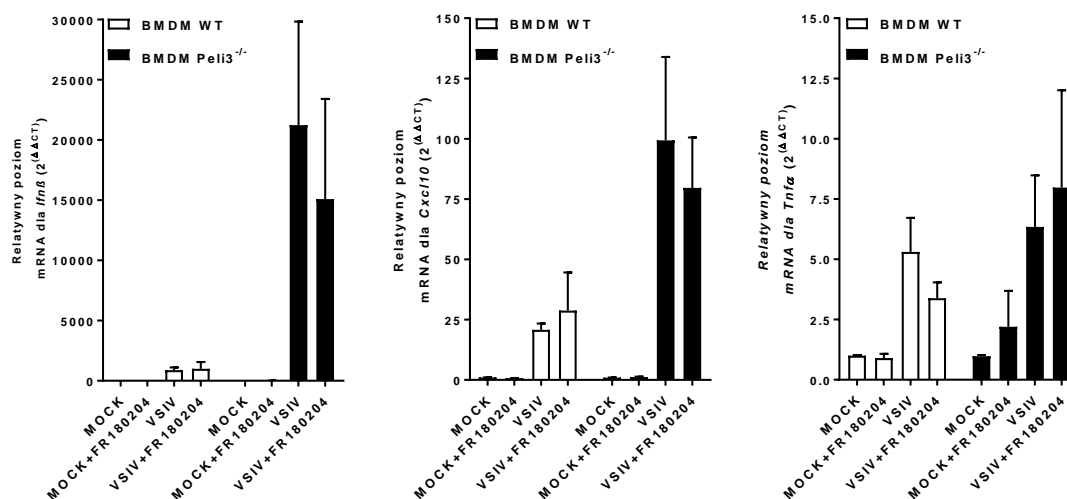
Otrzymane wyniki pokazały, że w komórkach BMDM pozbawionych białka Pellino3 nie dochodzi do fosforylacji kinaz ERK1/2, podczas gdy w komórkach BMDM typu dzikiego w szóstej godzinie po infekcji wirusowej aż 80% kinazy ERK1/2 występuje w formie ufosforylowanej (Rys 6.5. A, B). Zaobserwowano również, że na skutek zależnego od VSIV pobudzenia receptorów z rodziny RLR w komórkach BMDM typu dzikiego oraz *Peli3*<sup>-/-</sup> dochodzi do porównywalnej aktywacji kinaz JNK oraz p38 (Rys. 6.5. A).



## 6.6. Badanie wpływu kinaz białkowych ERK1/2 na ekspresję genów *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa* w komórkach BMDM po infekcji VSIV

### 6.6.1. Analiza poziomu transkrypcji genów efektorowych w komórkach BMDM po stymulacji wirusem VSIV w obecności inhibitora kinaz ERK1/2 - FR180204

Uzyskane dotychczas wyniki potwierdziły udział ligazy Pellino3 w regulacji aktywacji kinaz ERK1/2 zależnej od receptora RIG-I. W dalszym etapie badań skupiono się na określeniu roli kinaz ERK1/2 w badanym szlaku sygnałowym. W tym celu komórki BMDM WT oraz *Peli3*<sup>-/-</sup> infekowane były VSIV w obecności i przy braku selektywnego inhibitora ERK1/2 - FR180204. Następnie metodą real-time PCR określono zmiany poziomu ekspresji genów *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa*.

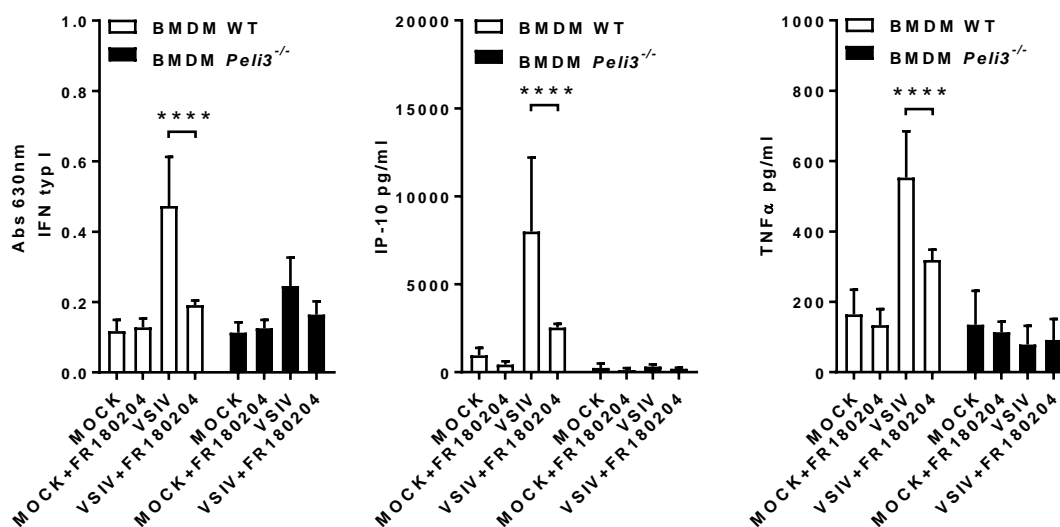


Rys. 6.6.1. Poziom ekspresji genu *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa* w komórkach BMDM w odpowiedzi na infekcję wirusową w obecności inhibitora FR180204. Komórki infekowano VSIV w ilości 1,5 MOI. Kontrolę stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznego z tym, w którym zawieszono wirusy (MOCK). Hodowle preinkubowano przez godzinę z FR180204 w stężeniu 2 μM, a następnie dodawano VSIV na 8 godzin. Po tym czasie z komórek izolowano całkowite RNA i przepisywano je na cDNA. Metodą real-time PCR oznaczano relatywny poziom ekspresji genu *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa*, jako genu referencyjnego użyto genu *Hprt1*.

Otrzymane wyniki wskazały, że zarówno w komórkach BMDM typu dzikiego, jak i tych pozbawionych białka Pellino3 dodatek selektywnego inhibitora kinaz ERK1/2 nie powoduje zmian w poziomie produkcji mRNA dla *Ifnβ*, *Cxcl10* oraz *Tnfa* (Rys. 6.6.1.).

### 6.6.2. Analiza poziomu produkcji interferonu typu I, IP-10 oraz TNF $\alpha$ przez BMDM po stymulacji wirusem VSIV w obecności FR180204

W kolejnym etapie badano rolę kinaz EKR1/2 w procesie wydzielania cytokin. Komórki BMDM WT oraz *Peli3*<sup>-/-</sup> infekowane były VSIV w obecności i przy braku selektywnego inhibitora ERK1/2 - FR180204. Następnie poziom produkcji interferonu typu I oraz cytokin prozapalnych mierzony był za pomocą testów biologicznych BioAssay oraz ELISA. \*\*\*\* p<0,0001.

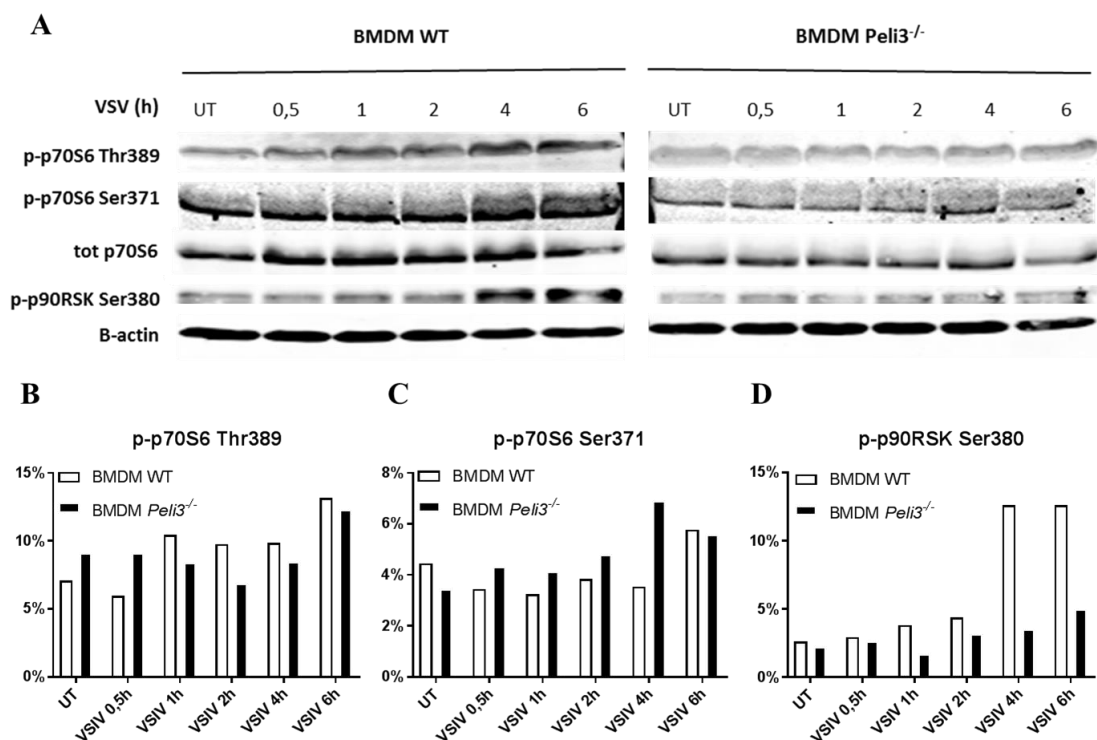


**Rys. 6.6.2. Poziom produkcji interferonu typu I oraz cytokin TNF $\alpha$  i IP-10 w komórkach BMDM w odpowiedzi na infekcję wirusową.** Komórki infekowano VSIV w ilości 1,5 MOI. Kontrolę stanowiły komórki z dodatkiem medium identycznym z tym, w którym zawieszono wirusy (MOCK). Hodowle preinkubowano przez godzinę z FR180204 w stężeniu 2 $\mu$ M, a następnie dodawano VSIV na 16 godzin. Po tym czasie zbierano nadsącz komórkowy, w którym analizowano poziom wydzielonych białek metodą BioAssay lub ELISA. \*\*\*\* p<0,0001.

Analiza wyników wykazała, że w BMDM WT dodatek inhibitora FR180204 znacząco obniża poziom produkcji zarówno cytokin IP-10 i TNF $\alpha$ , jak i biologicznie aktywnego interferonu typu I (Rys. 6.6.2.). Zaobserwowano ponadto, że sam dodatek inhibitora nie wpływa w sposób istotny na obniżenie podstawowego poziomu badanych cytokin w komórkach BMDM WT i *Peli3*<sup>-/-</sup>.

## **6.7. Badanie aktywacji kinaz p70S6 oraz p90RSK w komórkach BMDM po infekcji VSIV**

Biorąc pod uwagę uzyskane dotychczas wyniki postanowiono zbadać wpływ kinaz ERK1/2 na proces inicjacji translacji w komórce. Po przeszukaniu danych literaturowych do dalszych badań wytypowane zostały dwie kinazy: p70S6 oraz p90RSK (119–121). Aby zbadać wpływ białka Pellino3 na aktywację kinaz p70S6 oraz p90RSK po infekcji wirusowej wykorzystano technikę western blot z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko ufosforylowanym formom kinaz białkowych p70S6 (p-p70S6S Thr389 i p-p70S6 Ser371) oraz p90RSK (p-p90RSK Ser380). Poziom aktywnych form badanych białek skorelowano z całkowitą ilością kinaz p70S6 (tot-p70S6) oraz z całkowitą ilością białka w lizacie komórkowym reprezentowaną przez ilość  $\beta$ -aktyny.

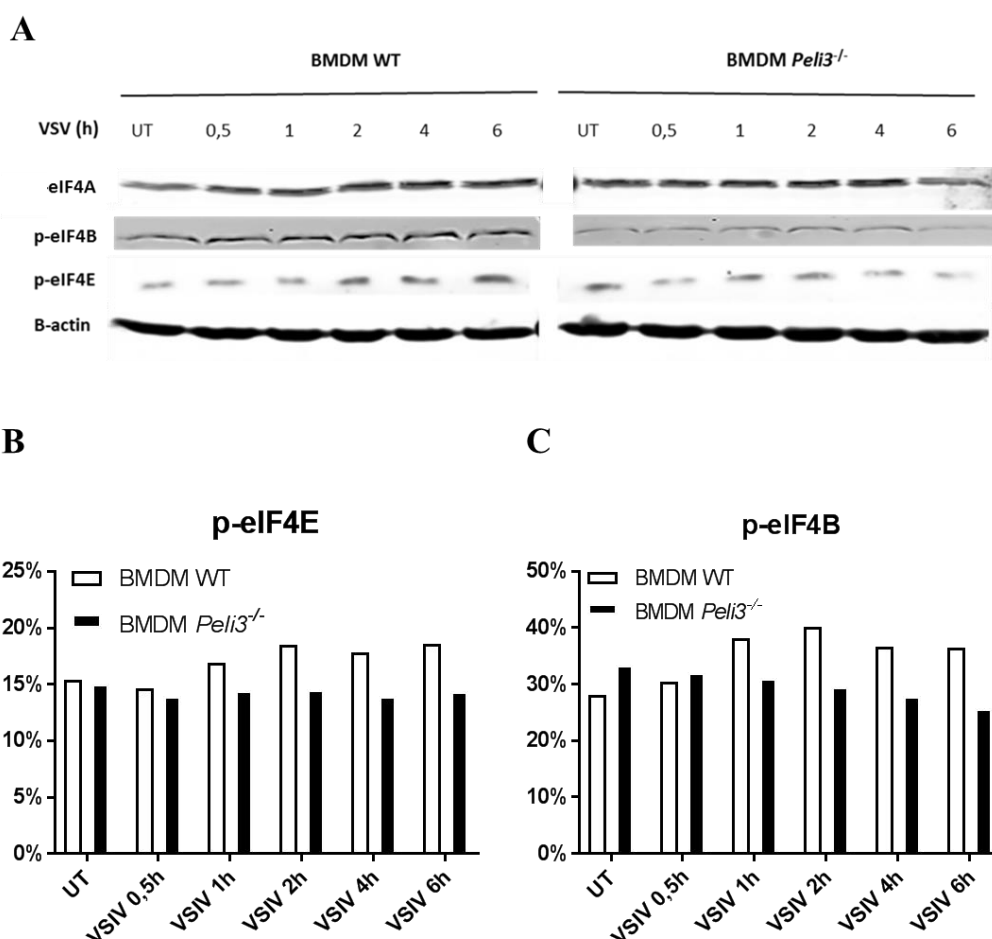


**Rys. 6.7. Analiza aktywacji kinaz p70S6 oraz p90RSK w komórkach BMDM po infekcji wirusem VSIV.** Komórki infekowano VSIV w ilości 1,5 MOI we wskazanych czasach. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję prowadzono z użyciem przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem w aparacie Odyssey CLx. Analizę densytometryczną przeprowadzono z użyciem programu Image Studio ver 2.0. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.

Analiza densytometryczna uzyskanych wyników wskazuje, że w wyniku infekcji wirusowej dochodzi do słabej fosforylacji kinazy p70S6 i jest ona niezależna od obecności białka Pellino3 w komórce (Rys. 6.7. A, B, C). Jednocześnie w komórkach BMDM WT zaobserwowano wysoki poziom aktywacji kinazy p90RSK, natomiast w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> fosforylacja tej kinazy praktycznie nie zachodzi. Dodatkowo punkt czasowy aktywacji p90RSK koreluje z czasem aktywacji kinaz ERR1/2 (Rys. 6.7. A, D).

## 6.8. Badanie czynników inicjacji translacji eIF4A, eIF4B oraz eIF4E w komórkach BMDM po infekcji VSIV

W kolejnym etapie przeanalizowano poziom fosforylacji dwóch czynników inicjacji translacji: eIF4B i eIF4E, których aktywacja może być zależna od kinazy p90RSK (122–124). Poziom aktywnych form badanych czynników skorelowany został z całkowitą ilością białka w komórce reprezentowaną przez ilość  $\beta$ -aktyny. Dodatkową kontrolę stanowiła analiza poziomu czynnika eIF4A, który występuje w komórce na stałym poziomie.



**Rys. 6.8. Analiza aktywacji czynników inicjacji translacji w komórkach BMDM po infekcji wirusem VSIV.** Komórki infekowano VSIV w ilości 1,5 MOI we wskazanych czasach. Lizaty komórkowe rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję prowadzono z użyciem przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z podczerwonym fluoroforem w aparacie Odyssey CLx. Analizę densytometryczną przeprowadzono z użyciem programu Image Studio ver 2.0. Wynik przedstawia reprezentatywny obraz wybrany spośród trzech powtórzeń.

Uzyskane wyniki wykazały, że w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> po infekcji wirusowej nie dochodzi do aktywacji czynników inicjacji translacji eIF4B oraz eIF4E, podczas gdy w komórkach typu dzikiego zauważyć można wzrost poziomu aktywacji wymienionych białek (Rys. 6.8.). Powyższe obserwacje wskazują, że Pellino3 może pełnić rolę regulatora inicjacji translacji zależnej od infekcji VSIV i że regulacja ta zachodzi z wykorzystaniem ścieżki ERK1/2-p90RSK.

## 7. Podsumowanie wyników

1. Ligaza Pellino3 jest zaangażowana w system przekazywania sygnału od receptora RIG-I i reguluje produkcję zależnych od receptora cytokin: IFN $\beta$ , IP-10 i TNF $\alpha$ .
2. Nokaut genu *Peli3* nie wpływa na ekspresję żadnych genów zaangażowanych w rozpoznanie VSIV przez makrofagi. Brak białka Pellino3 w makrofagach skutkuje natomiast zwiększeniem produkcji mRNA dla IFN $\beta$  oraz IP-10 po infekcji VSIV. Wynika to z faktu wydajniejszej fosforylacji czynników transkrypcyjnych IRF3/7 w komórkach *Peli3*<sup>-/-</sup>, podczas gdy aktywacja NF- $\kappa$ B pozostaje bez zmian.
3. Ligaza Pellino3 jest niezbędna do aktywacji ścieżki sygnałowej ERK1/2-p90RSK indukowanej VSIV. Szlak kinaz ERK1/2 nie jest zaangażowany w proces transkrypcji mRNA dla białek IFN $\beta$ , IP-10 oraz TNF $\alpha$ , wpływa natomiast pozytywnie na proces translacji tych cytokin poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych eIF4E oraz eIF4B.

## 8. Dyskusja

W ostatniej dekadzie wewnątrzkomórkowe receptory rozpoznające egzogenny RNA z rodziny RLR zyskały coraz większe zainteresowanie badaczy. Główny nurt badań koncentruje się na wzajemnych relacjach RLR z receptorami TLR związanymi z błoną komórkową. Dzięki współdziałaniu tych receptorów możliwe jest efektywne rozpoznawanie infekcji wirusowej, niezależnie od drogi wniknięcia wirusa do komórki. I tak, receptory błonowe rozpoznają infekcję wirusami, które wykorzystują pęcherzyki endocytarne w swoim cyklu namnażania się, natomiast receptory cytoplazmatyczne zdolne są do rozpoznania wirusów, które atakują komórki niezależnie od ich systemów transportu pęcherzykowego. Dodatkowo receptory z rodziny TLR rozpoznają różne rodzaje wirusowego RNA, jak ssRNA, dsRNA, czy nawet DNA bogate w wyspy CpG. Wewnątrzkomórkowe receptory z rodziny RLR najsilniej rozpoznają dsRNA pojawiający się w cytoplazmie komórki w trakcie powielania wirusowego materiału genetycznego.

Kaskady sygnałowe uruchamiane po rozpoznaniu wirusa przez receptory RLR nie są w pełni scharakteryzowane i pozostają obiektem badań wielu grup badawczych. Opublikowane doniesienia literaturowe potwierdzają udział RLR w aktywacji produkcji interferonu typu I oraz cytokin, takich jak TNF $\alpha$  i IP-10 (68). Jednocześnie wiadomo, że inicjacja transkrypcji genów kodujących te cytokiny zachodzi poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych IRF3/7 oraz NF- $\kappa$ B (125). W niniejszej pracy opisano wpływ ligazy Pellino3, która jest białkiem o właściwościach immunomodulacyjnych, na szlaki sygnałowe receptorów RLR.

W pierwszym etapie badań opracowano model badawczy, który wykorzystany został do badań infekcyjnych na mysich makrofagach pochodzenia szpikowego. Bazując na danych literaturowych wstępnie wytypowano cztery wirusy, których materiał genetyczny złożony jest z ujemnie spolaryzowanego jednoniciowego RNA. Wśród wybranych wirusów znalazły się: HPIV3, wirus grypy typu A szczep H3N2, HRSV oraz VSIV, o których wiadomo, że rozpoznawane są przez receptory z rodziny RLR (68, 69, 74, 125–129). Wyniki jednoznacznie wskazały, że spośród badanych wirusów zdolnym do pobudzenia transkrypcji genu kodującego interferon  $\beta$  w komórkach BMDM WT jest jedynie VSIV (Rys. 6.1.1.). Szczegółowa analiza profilu cytokin produkowanych przez zainfekowane komórki potwierdziła, że dochodzi w nich zarówno do procesów aktywacji



transkrypcji, jak i translacji. Tym samym wykazano, że w komórkach infekowanych wirusem VSIV dochodzi do produkcji cytokin prozapalnych TNF $\alpha$  oraz IP-10, a także biologicznie aktywnego interferonu typu I (Rys. 6.1.2.). Dodatkowo wykazano, że ilość produkowanych cytokin zależy od czasu stymulacji wirusem. Po infekcji trwającej 16 godzin obserwuje się nawet czterokrotny wzrost ilości wytwarzanych cytokin w porównaniu do ich poziomu obserwowanego po 8 godzinach infekcji (Rys. 6.1.2.). Wyniki te są spójne z opisanymi w literaturze badaniami nad zależną od RLR odpowiedzią na infekcje VSIV (125, 129). Ponadto wykazano, że w trakcie trwania infekcji wirusowej wrasta ekspresja genu kodującego Pellino3 (Rys. 6.1.3.). Obserwacja ta koresponduje z wynikami literaturowymi, z których wynika, że białko Pellino3 ekspresjonowane jest na wyższym poziomie po stymulacji komórek syntetycznym ligandem poly(I:C), który imituje wirusowy dsRNA (113).

W kolejnym etapie badań ustalono czy odpowiedź przeciwwirusowa obserwowana w komórkach BMDM po infekcji wirusowej jest zależna od receptorów RLR. Z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym wykazano, że transkrypcja genów kodujących interferon  $\beta$  oraz IP-10 w komórkach BMDM po infekcji VSIV jest całkowicie zależna od obecności białka adaptorowego MAVS (Rys. 6.2.1.). W przypadku genu kodującego TNF $\alpha$  zaobserwowano natomiast znaczący, około trzykrotny, spadek jego ekspresji w komórkach pozbawionych genu *Mavs* w porównaniu do komórek typu dzikiego (Rys. 6.2.1.). Otrzymane dane odpowiadają wynikom uzyskanym metodami ELISA oraz BioAssay, które potwierdzają, że komórki BMDM *Mavs*<sup>-/-</sup> w odpowiedzi na infekcję VSIV nie zwiększają produkcji interferonu typu pierwszego oraz cytokin IP-10 i TNF $\alpha$  (Rys. 6.2.2.). Ze względu na to, że białko MAVS jest jedynym znanym adaptorem sygnału, który jest indukowany po związaniu liganda przez receptory z rodziny RLR (130), co zostało szczegółowo opisane w rozdziale 3.2.6., uzyskane dane potwierdziły, że w komórkach BMDM rozpoznanie infekcji VSIV całkowicie zależy od receptorów z rodziny RLR. Uzyskane wyniki są spójne z danymi literaturowymi wskazującymi, iż odpowiedź przeciwwirusowa na infekcję VSIV jest zależna od receptorów RLR (125, 129).

Rodzina receptorów RLR składa się z dwóch w pełni funkcjonalnych receptorów zdolnych do przekazania sygnału na białko adaptorowe MAVS, a mianowicie receptorów RIG-I oraz MDA5. W związku z tym ustalono, który z receptorów rodziny RLR jest odpowiedzialny za wytworzenie przeciwwirusowej kaskady sygnałowej po infekcji VSIV. Do tego celu wykorzystano komórki ludzkiej linii A549, które ekspresjonują

syntetyczny gen projektowany na bazie genu kodującego lucyferazę morskich widłonogów. Gen ten znajduje się pod kontrolą minimalnego promotora ISG54 (ang. interferon stimulated gene 54) oraz pięciu sekwencji ISRE (ang. interferon-sensitive response element). System ten daje możliwość monitorowania aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF. Dodatkowo poza opisanym systemem, badane komórki posiadają znokautowany gen kodujący RIG-I lub MDA5. Wykorzystanie tego systemu pozwoliło ustalić, że w komórkach A549 po infekcji VSIV dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych IRF na drodze zależnej od receptora RIG-I. Wynika to bezpośrednio z braku ekspresji lucyferazy w komórkach A549 RIG-I KO po infekcji wirusowej, podczas gdy w komórkach A549 MDA5 KO po infekcji VSIV poziom ekspresji lucyferazy jest na podobnym poziomie, co w komórkach kontrolnych (Rys. 6.2.3.). Podobne obserwacje można znaleźć również w danych literaturowych (129). Omówione do tej pory wyniki potwierdziły, że aktywacja odpowiedzi przeciwwirusowej po infekcji VSIV zależna jest od receptora RIG-I.

Następnym etapem pracy było ustalenie udziału białka Pellino3 w ścieżce sygnałowej zależnej od pobudzenia receptora RIG-I przez VSIV. Badania rozpoczęto od ustalenia czy delecja genu kodującego białko Pellino3 w komórkach BMDM wpływa na poziom ekspresji genów *Ddx58*, *Ifih1* oraz *Mavs*, kodujących odpowiednio białka RIG-I, MDA5 oraz MAVS. Analiza wykazała, że nokaut genu *Peli3* nie wpływa na poziom ekspresji receptorów z rodziny RLR i białka adaptorowego MAVS (Rys. 6.3.3.).

W pierwszym etapie badań nad wpływem białka Pellino3 na odpowiedź przeciwwirusową w komórkach BMDM zmierzono poziom transkrypcji genów *Ifn $\beta$* , *Cxcl10* oraz *Tnfa*. Analiza wyników real-time PCR wykazała, że delecja genu *Peli3* w komórkach BMDM skutkuje zwiększeniem produkcji mRNA dla *Ifn $\beta$*  oraz *Cxcl10*, podczas gdy poziom ekspresji genu *Tfn* pozostaje bez zmian (Rys. 6.3.). Wyniki te wraz z wcześniejszym rezultatem wskazującym na aktywację czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF po infekcji VSIV (Rys. 6.2.3.) sugerują zaangażowanie białka Pellino3 jako negatywnego regulatora w procesie regulacji transkrypcji genów IRF zależnych. Podobne wyniki można odnaleźć w literaturze, gdzie Pellino3 jest negatywnym regulatorem aktywacji czynników IRF po aktywacji receptora TLR3 (113). Szczegółowe badanie roli białka Pellino3 w aktywacji czynników transkrypcyjnych potwierdziło, że w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> dochodzi do podwyższonej fosforylacji czynników IRF3 oraz IRF7 (Rys. 6.4.1. A, B). Jednocześnie wykazano, że degradacja podjednostki inhibitorowej czynnika NF- $\kappa$ B - I $\kappa$ B $\alpha$  nie jest zaburzona (Rys. 6.4.1. A). Otrzymane

wyniki tłumaczą opisane wyżej różnice w poziomie produkcji mRNA dla *Ifn $\beta$* , *Ip-10* (Rys. 6.3.). Dodatkowo brak różnic w poziomie produkcji mRNA dla *Tnfa* (Rys. 6.3.) spójny jest z niezmiennym poziomem degradacji I $\kappa$ B $\alpha$ .

W kolejnym etapie badań, korzystając z technik ELISA i BioAssay, określono ilość produkowanych cytokin: IFN $\beta$ , IP-10 i TNF $\alpha$ . Uzyskane wyniki były całkowicie przeciwne do wcześniejszych analiz poziomu mRNA dla tych cytokin. Okazało się, że mimo podwyższonego poziomu produkcji mRNA dla *Ifn $\beta$*  oraz *Ip-10*, a także braku zmian w przypadku mRNA dla *Tnfa* poziom białka badanych cytokin w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> po infekcji VSIV jest znacząco obniżony (Rys. 6.3.2.). Obserwowane rozbieżności sugerują, że białko Pellino3, poza tym, że jest negatywnym regulatorem transkrypcji zależnej od czynników IRF3/7 pełni również rolę regulatora translacji w komórkach BMDM po infekcji VSIV.

Kontrolę dla infekcji wirusowej stanowiło zakażenie bakteryjne. Komórki BMDM infekowano żywymi bakteriami *L. monocytogenes*, gdyż bakterie te rozpoznawane są głównie przez receptor TLR2, bez udziału RLR (131). Dane literaturowe wskazują, że białko Pellino3 reguluje ścieżkę sygnałową aktywowaną przez TLR2, jednakże nie wpływa na odpowiedź zależną od aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF, a jedynie na ścieżkę NF- $\kappa$ B (111). Uzyskane wyniki z eksperymentu z zakażeniem bakteryjnym wskazują, że brak białka Pellino3 w BMDM nie wpływa na poziom produkcji interferonu typu I oraz IP-10 i jest pozytywnym regulatorem produkcji TNF $\alpha$  (Rys. 6.3.2.). Analizy te są spójne z danymi literaturowymi (111, 131).

Wcześniejsze doniesienia literaturowe dotyczące ligazy ubikwityny Pellino3 wskazują, że jest ona powiązana z regulacją aktywacji kinaz z rodziny MAP, w szczególności p38 oraz JNK (84, 108). W związku z tym postanowiono zbadać poziom fosforylacji wybranych kinaz z rodziny MAP w komórkach BMDM WT oraz *Peli3*<sup>-/-</sup> infekowanych VSIV. Do tego celu wykorzystano technikę Western blot. Wyniki wskazały, że kinazy p38, JNK oraz ERK1/2 w komórkach BMDM po infekcji VSIV ulegają znacznej fosforylacji już w czwartej godzinie po dodaniu wirusa do hodowli komórkowej (Rys. 6.5. A). Sugeruje to, że badane kinazy są zaangażowane w proces odpowiedzi przeciwwirusowej zależnej od RIG-I. Ponadto eksperyment wskazuje, że aktywacja kinaz ERK1/2 po infekcji VSIV jest całkowicie zależna od obecności w komórce białka Pellino3 (Rys. 6.5. A). Szczegółowa analiza densytometryczna pokazuje, że w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> fosforylacja kinaz ERK1/2 wzrasta po infekcji

wirusowej jedynie o 14%, podczas gdy w komórkach typu dzikiego poziom aktywacji kinaz ERK1/2 po infekcji VSIV wzrasta aż o 80% (Rys. 6.5. B).

Z uwagi na unikatowość tej obserwacji postanowiono zbadać, jaki wpływ na odpowiedź przeciwwirusową zależną od RIG-I ma aktywacja kinaz ERK1/2. W tym celu wykorzystano selektywny inhibitor ERK1/2 - FR180204, który dodany do hodowli komórkowej na godzinę przed infekcją wirusową blokuje w komórce cały sygnał przekazywany przez kinazy ERK1/2 (132).

Pierwsza analiza wykonana techniką real-time PCR wykazała, że zahamowanie ERK1/2 nie wpływa na poziom produkcji mRNA dla *Ifn $\beta$* , *Cxcl10* oraz *Tnfa* w komórkach BMDM po infekcji VSIV (Rys. 6.6.1.). Ponadto, opisywany wcześniej podwyższony poziom produkcji mRNA dla *Ifn $\beta$*  oraz *Ip-10* w komórkach pozbawionych *Pellino3* (Rys. 6.3.1.) również nie uległ zmianie po dodaniu FR180204 do hodowli komórkowej przed infekcją wirusową (Rys. 6.6.1.). Otrzymane wyniki wskazują, że aktywacja kinaz ERK1/2 nie jest istotna dla procesu aktywacji transkrypcji genów efektorowych po infekcji. W kolejnych eksperymentach badających wpływ kinaz ERK1/2, wykonanych z użyciem technik ELISA i BioAssay, wykazano, że zahamowanie aktywności kinaz ERK1/2 istotnie obniża poziom produkcji zarówno biologicznie aktywnego interferonu typu I, jak i cytokin IP-10 oraz TNF $\alpha$  (Rys. 6.6.2.). Dodatkowo, obserwowany spadek poziomu produkcji biologicznie aktywnego interferonu typu I w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> zainfekowanych VSIV po dodatku FR180204 obniża się do poziomu kontrolnego (Rys. 6.6.2.). Wyniki te jednoznacznie wskazują, że ścieżka sygnałowa kinaz z rodziny MAP związana z aktywacją ERK1/2 ma istotny wpływ na regulację poziomu translacji wyprodukowanego na skutek infekcji wirusowej mRNA kodującego białka IFN $\beta$ , IP-10 oraz TNF $\alpha$ . Jednocześnie nie wpływa ona na sam poziom produkcji mRNA badanych cytokin.

Przegląd literatury pozwolił wybrać białka, których aktywacja może prowadzić do zmian w poziomie aktywacji inicjacji translacji. Pierwszym z wytypowanych białek była kinaza p70S6, opisana jako kinaza należąca do kaskady sygnałowej mTOR (ang. mammalian target of rapamycin kinase) oraz ERK1/2 (133, 134). Kinaza p70S6 jest dobrze scharakteryzowana jako białko regulujące formowanie kompleksu inicjacji translacji (121, 135). Drugim z wytypowanych białek była kinaza p90RSK, opisana w literaturze jako białko mogące wpływać na poziom aktywacji czynników inicjacji translacji takich jak eIF4B oraz eIF4E (122, 124). Dodatkowo p90RSK jest szeroko opisywana jako substrat dla kinaz ERK1/2 (119, 123, 136).

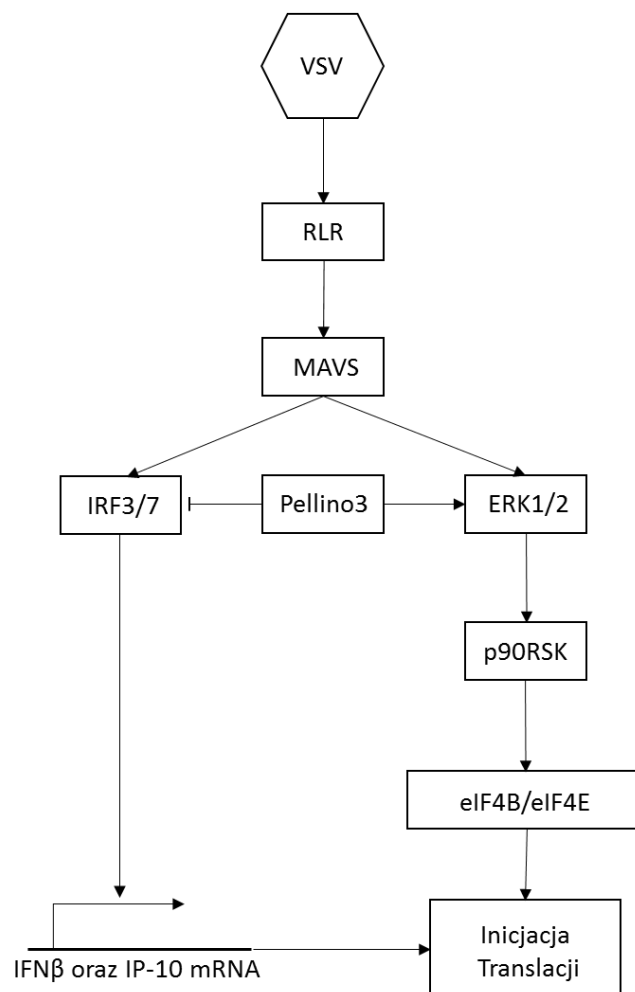
Badanie poziomu aktywacji kinaz p70S6 oraz p90RSK zostało przeprowadzone za pomocą techniki Western blot. Przeprowadzona analiza wykazała, że w komórkach BMDM typu dzikiego oraz BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup> kinaza p70S6 aktywowana jest w niewielkim stopniu i niezależnie od obecności białka Pellino3 w komórce (Rys. 6.7. A, B, C). Jednocześnie pokazano, że w komórkach stymulowanych wirusem dochodzi do znaczącego, bo prawie trzykrotnego, wzrostu aktywacji kinazy p90RSK. Ponadto aktywacja ta nie była obserwowana w komórka z nokautem genu kodującego białko Pellino3 (Rys. 6.6. A, D). Otrzymane wyniki wskazują, że w komórkach BMDM istnieje szlak sygnałowy kinaz ERK1/2-p90RSK zależny od aktywacji receptora RIG-I. Ponadto szlak ten regulowany jest przez obecność białka Pellino3.

Kolejny eksperyment miał na celu określenie czy obserwowane zmiany w kaskadzie sygnałowej mają wpływ na aktywację czynników inicjacji translacji. Jak opisano powyżej, dane literaturowe wskazują na możliwość aktywacji czynników inicjacji, takich jak eIF4B i eIF4E przez kinazę p90RSK (122, 124). Do analizy czynników inicjacji translacji włączone zostało również białko eIF4A, które nie oddziałuje z żadną z badanych w tej pracy kinaz oraz nie wymaga fosforylacji (137).

Wyniki uzyskane techniką western blot wykazały, że poziom białka eIF4A pozostaje niezmienny w trakcie postępu infekcji wirusowej oraz nie zależy od obecności białka Pellino3 (Rys. 6.7 A). Natomiast analiza densytometryczna przeprowadzona dla czynników inicjacji translacji eIF4B oraz eIF4E (Rys. 6.8. A) wykazała kilkuprocentowy wzrost aktywacji białka eIF4E oraz około 10% wzrost aktywacji białka eIF4B (Rys. 6.8. B, C) w trakcie infekcji VSIV. Ponadto zaobserwowana fosforylacja nie występowała w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup>.

Reasumując, obserwacje poziomu produkcji mRNA dla badanych cytokin (Rys. 6.3.1.) oraz podwyższony poziom fosforylacji czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF (Rys. 6.4.1.) w komórkach BMDM *Peli3*<sup>-/-</sup>, poparty danymi literaturowymi, wskazuje na rolę białka Pellino3 w negatywnej regulacji transkrypcji genów zależnych od czynników transkrypcyjnych IRF3/7 (113). Jednocześnie otrzymane wyniki pokazujące wpływ białka Pellino3 na poziom produkcji cytokin (Rys. 6.3.2.), a także na aktywację kinaz ERK1/2 (Rys. 6.5.) oraz p90RSK (Rys. 6.7.) wskazują na to, że białko Pellino3 pozytywnie reguluje inicjację translacji mRNA dla cytokin IFN $\beta$ , IP-10 oraz TNF $\alpha$  produkowanych po infekcji VSIV. Poziom ekspresji genu kodującego białko Pellino3 jest również zależny od infekcji wirusowej i wzrasta wraz z czasem jej trwania (Rys. 6.1.3.) (113), dodatkowo zmiany w ekspresji białka Pellino3 korespondują ze

zmianami w produkcji zarówno mRNA, jak i białek IFN $\beta$  oraz IP-10. Brak Pellino3 w komórkach skutkuje kilkukrotnie zwiększoną produkcją mRNA dla IFN $\beta$  oraz IP-10 w ósmej godzinie po infekcji wirusowej (Rys. 6.3.1.). W tym czasie w komórkach WT obserwowane jest rozpoczęcie produkcji badanych białek przeciwwirusowych (Rys. 6.3.1). Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pozwalają zaproponować model, w którym białko Pellino3 działa jako przełącznik molekularny między transkrypcją, a translacją genów efektorowych indukowanych VSIV. Model zakłada, że podczas infekcji wirusowej dochodzi do szybkiej aktywacji czynników transkrypcyjnych zarówno IRF3/7, jak i NF- $\kappa$ B, a tym samym dochodzi do produkcji mRNA dla badanych cytokin. Jednocześnie dochodzi do podwyższenia ekspresji genu kodującego białko Pellino3. Nagromadzenie krytycznej ilości ligazy Pellino3 wycisza dalszą produkcję mRNA genów efektorowych i promuje aktywację szlaku sygnałowego ERK1/2-p90RSK, prowadząc do zwiększonego poziomu inicjacji translacji konkretnych cząsteczek mRNA kodujących cytokiny przeciwwirusowe (Ryc. 5).



**Ryc.5 Schemat regulacji przeciwwirusowych szlaków sygnałowych.**

## 9. Wnioski

1. Pellino3 jest negatywnym regulatorem produkcji mRNA dla *Ifn $\beta$*  i *Ip-10* przez wpływ na fosforylację czynników transkrypcyjnych IRF3/7.
2. Pellino3 jest pozytywnym regulatorem produkcji białek IFN typu I, IP-10 oraz TNF $\alpha$  przez regulację aktywacji szlaku ERK1/2-p90RSK.
3. Pellino3 pełni rolę przełącznika molekularnego między transkrypcją, a translacją w szlaku sygnałowym aktywowanym przez receptor RIG-I po infekcji wirusem VSIV w komórkach BMDM.

## 10. Spis Rycin i rysunków

### 10.1. Ryciny

Ryc. 1 Schemat struktury domenowej białek RIG-I, MDA5 oraz LGP2. ....	24
Ryc. 2 Schemat szlaków sygnałowych aktywowanych przez receptory RLR. ....	28
Ryc. 3 Rodzaje modyfikacji białek przez różne rodzaje rozgałęzień łańcucha ubikwityny. ...	31
Ryc. 4 Miejsca potwierdzonych modyfikacji białka Pellino1. ....	32
Ryc.5 Schemat regulacji przeciwwirusowych szlaków sygnałowych. ....	78

### 10.2. Rysunki

Rys. 6.1.1. Poziom ekspresji genu <i>Ifn<math>\beta</math></i> w komórkach BMDM WT w odpowiedzi na infekcję wirusową. ....	53
Rys. 6.1.2 Poziom produkcji interferonów typu I, IP-10 oraz TNF $\alpha$ w komórkach BMDM WT po infekcji VSIV. ....	54
Rys. 6.1.3. Poziom ekspresji genu <i>Peli3</i> w komórkach BMDM WT w odpowiedzi na infekcję wirusową. ....	55
Rys. 6.2.1. Poziom ekspresji genu <i>Ifn<math>\beta</math></i> , <i>Cxcl10</i> oraz <i>Tnfa</i> w komórkach BMDM w odpowiedzi na infekcję wirusową. ....	56
Rys. 6.2.2. Poziom produkcji interferonów typu I oraz cytokin TNF $\alpha$ i IP-10 w komórkach BMDM w odpowiedzi na infekcję wirusową. ....	57
Rys. 6.2.3. Aktywacja czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF w komórkach A549 w odpowiedzi na infekcję wirusową. ....	58
Rys. 6.3.1. Poziom ekspresji genu <i>Ifn<math>\beta</math></i> , <i>Cxcl10</i> oraz <i>Tnfa</i> w komórkach BMDM w odpowiedzi na infekcję wirusową. ....	59
Rys. 6.3.2. Poziom produkcji interferonów typu I oraz cytokin TNF $\alpha$ i IP-10 w komórkach BMDM w odpowiedzi na infekcję wirusową. ....	60
Rys. 6.3.3. Analiza ekspresji genów <i>Ddx58</i> , <i>Ifih1</i> , <i>Mavs</i> oraz <i>Peli3</i> w BMDM WT oraz BMDM <i>Peli3</i> <sup>-/-</sup> . ....	61
Rys. 6.4. Analiza aktywacji czynników transkrypcyjnych w komórkach BMDM po infekcji wirusem VSIV. ....	62



Rys. 6.5. Kinetyka aktywacji MAP kinaz w komórkach BMDM po infekcji wirusem VSIV. .....	64
Rys. 6.6.2. Poziom produkcji interferonu typu I oraz cytokin TNF $\alpha$ i IP-10 w komórkach BMDM w odpowiedzi na infekcję wirusową. ....	66
Rys. 6.7. Analiza aktywacji kinaz p70S6 oraz p90RSK w komórkach BMDM po infekcji wirusem VSIV.....	68
Rys. 6.8. Analiza aktywacji czynników inicjacji translacji w komórkach BMDM po infekcji wirusem VSIV.....	69

## 11. Literatura

1. Bianchi ME. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81:1–5.
2. Tolle LB, Standiford TJ. 2013. Danger-associated molecular patterns (DAMPs) in acute lung injury. *J Pathol* 229:145–156.
3. Akira S, Hemmi H. 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85:85–95.
4. Marsh M, Helenius A. 2006. Virus entry: Open sesame. *Cell* 124:729–740.
5. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458:514–8.
6. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. 2013. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339:786–91.
7. Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S. 2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 34:2541–2550.
8. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732–738.
9. Gantier MP, Tong S, Behlke MA, Xu D, Phipps S, Foster PS, Williams BRG. 2008. TLR7 is involved in sequence-specific sensing of single-stranded RNAs in human macrophages. *J Immunol* 180:2117–24.
10. Oldenburg M, Krüger A, Ferstl R, Kaufmann A, Nees G, Sigmund A, Bathke B, Lauterbach H, Suter M, Dreher S, Koedel U, Akira S, Kawai T, Buer J, Wagner H, Bauer S, Hochrein H, Kirschning CJ. 2012. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* 337:1111–5.
11. Creagh EM, O’Neill LAJ. 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* 27:352–357.
12. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. 2013. Cytosolic Sensing of Viruses. *Immunity* 38:855–869.
13. Kawai T, Akira S. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 21:317–337.
14. Jin MS, Lee J-O. 2008. Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand

- Complexes. *Immunity* 29:182–191.
15. Vercammen E, Staal J, Beyaert R. 2008. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev* 21:13–25.
  16. Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T. 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1364–1369.
  17. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M. 2005. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 280:5571–80.
  18. Berke IC, Li Y, Modis Y. 2013. Structural basis of innate immune recognition of viral RNA. *Cell Microbiol* 15:386–394.
  19. Takada E, Okahira S, Sasai M, Funami K, Seya T, Matsumoto M. 2007. C-terminal LRRs of human Toll-like receptor 3 control receptor dimerization and signal transmission. *Mol Immunol* 44:3633–3640.
  20. Choe J, Kelker MS, Wilson IA. 2005. Crystal Structure of Human Toll-Like Receptor 3 (TLR3) Ectodomain. *Science* (80- ) 309:581–585.
  21. Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, Davies DR. 2008. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 320:379–81.
  22. Matsumoto M, Seya T. 2008. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev* 60:805–812.
  23. Sen GC, Sarkar SN. 2005. Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:1–14.
  24. Lafon M, Megret F, Lafage M, Prehaud C. 2006. The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA. *J Mol Neurosci* 29:185–94.
  25. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529–31.
  26. Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, Tomai MA, Alkan SS, Vasilakos JP. 2005. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol* 174:1259–68.
  27. Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S. 2002. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 3:499–499.

28. Jurk M, Kritzler A, Schulte B, Tluk S, Schetter C, Krieg AM, Vollmer J. 2006. Modulating responsiveness of human TLR7 and 8 to small molecule ligands with T-rich phosphorothiate oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol* 36:1815–1826.
29. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168:4531–7.
30. Li T, He X, Jia H, Chen G, Zeng S, Fang Y, Jin Q, Jing Z. 2016. Molecular cloning and functional characterization of murine toll-like receptor 8. *Mol Med Rep* 13:1119–1126.
31. Barrat FJ. 2018. TLR8: No gain, no pain. *J Exp Med* 215:2964–2966.
32. Sarvestani ST, Stunden HJ, Behlke MA, Forster SC, McCoy CE, Tate MD, Ferrand J, Lennox KA, Latz E, Williams BRG, Gantier MP. 2015. Sequence-dependent off-target inhibition of TLR7/8 sensing by synthetic microRNA inhibitors. *Nucleic Acids Res* 43:1177–88.
33. Beignon A-S, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, Larsson M, Gorelick RJ, Lifson JD, Bhardwaj N. 2005. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* 115:3265–75.
34. Rua R, Lepelley A, Gessain A, Schwartz O. 2012. Innate sensing of foamy viruses by human hematopoietic cells. *J Virol* 86:909–18.
35. Triantafilou K, Vakakis E, Orthopoulos G, Ahmed MAE, Schumann C, Lepper PM, Triantafilou M. 2005. TLR8 and TLR7 are involved in the host's immune response to human parechovirus 1. *Eur J Immunol* 35:2416–2423.
36. Zucchini N, Bessou G, Traub S, Robbins SH, Uematsu S, Akira S, Alexopoulou L, Dalod M. 2008. Cutting Edge: Overlapping Functions of TLR7 and TLR9 for Innate Defense against a Herpesvirus Infection. *J Immunol* 180:5799–5803.
37. Cervantes JL, Weinerman B, Basole C, Salazar JC. 2012. TLR8: the forgotten relative revindicated. *Cell Mol Immunol* 9:434–438.
38. Baccarella A, Fontana MF, Chen EC, Kim CC. 2013. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. *Infect Immun* 81:4431–42.
39. Zhang Z, Ohto U, Shibata T, Krayukhina E, Taoka M, Yamauchi Y, Tanji H, Isobe T, Uchiyama S, Miyake K, Shimizu T. 2016. Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA.

- Immunity 45:737–748.
40. Zhang Z, Ohto U, Shibata T, Taoka M, Yamauchi Y, Sato R, Shukla NM, David SA, Isobe T, Miyake K, Shimizu T. 2018. Structural Analyses of Toll-like Receptor 7 Reveal Detailed RNA Sequence Specificity and Recognition Mechanism of Agonistic Ligands. *Cell Rep* 25:3371–3381.e5.
  41. Bao M, Liu Y-J. 2013. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell* 4:40–52.
  42. Opitz CA, Litzenburger UM, Lutz C, Lanz T V, Tritschler I, Köppel A, Tolosa E, Hoberg M, Anderl J, Aicher WK, Weller M, Wick W, Platten M. 2009. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells* 27:909–19.
  43. Signorino G, Mohammadi N, Patanè F, Buscetta M, Venza M, Venza I, Mancuso G, Midiri A, Alexopoulou L, Teti G, Biondo C, Beninati C. 2014. Role of Toll-like receptor 13 in innate immune recognition of group B streptococci. *Infect Immun* 82:5013–22.
  44. Shi Z, Cai Z, Sanchez A, Zhang T, Wen S, Wang J, Yang J, Fu S, Zhang D. 2011. A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *J Biol Chem* 286:4517–24.
  45. Liu X, Bennett RL, Cheng X, Byrne M, Reinhard MK, May WS, Jr. 2013. PKR regulates proliferation, differentiation, and survival of murine hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 121:3364–74.
  46. Nordén R, Nyström K, Olofsson S. 2009. Activation of host antiviral RNA-sensing factors necessary for herpes simplex virus type 1-activated transcription of host cell fucosyltransferase genes FUT3, FUT5, and FUT6 and subsequent expression of sLex in virus-infected cells. *Glycobiology* 19:776–788.
  47. Sadler AJ, Williams BRG. 2007. Structure and function of the protein kinase R. *Curr Top Microbiol Immunol* 316:253–92.
  48. Gray JS, Bae HK, Li JCB, Lau AS, Pestka JJ. 2008. Double-stranded RNA - Activated protein kinase mediates induction of interleukin-8 expression by deoxynivalenol, shiga toxin 1, and ricin in monocytes. *Toxicol Sci* 105:322–330.
  49. Silva AM, Whitmore M, Xu Z, Jiang Z, Li X, Williams BRG. 2004. Protein kinase R (PKR) interacts with and activates mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) in response to double-stranded RNA stimulation. *J Biol Chem* 279:37670–6.

50. Vijay-Kumar M, Gentsch JR, Kaiser WJ, Borregaard N, Offermann MK, Neish AS, Gewirtz AT. 2005. Protein kinase R mediates intestinal epithelial gene remodeling in response to double-stranded RNA and live rotavirus. *J Immunol* 174:6322–31.
51. Barral PM, Sarkar D, Su Z zhong, Barber GN, DeSalle R, Racaniello VR, Fisher PB. 2009. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: Key regulators of innate immunity. *Pharmacol Ther* 124:219–234.
52. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo Y-M, Gale M, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175:2851–8.
53. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5:730–737.
54. Kang D, Gopalkrishnan R V, Lin L, Randolph A, Valerie K, Pestka S, Fisher PB. 2004. Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* 23:1789–1800.
55. Takahashi K, Kumeta H, Tsuduki N, Narita R, Shigemoto T, Hirai R, Yoneyama M, Horiuchi M, Ogura K, Fujita T, Inagaki F. 2009. Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. *J Biol Chem* 284:17465–74.
56. Yoneyama M, Fujita T. 2008. Structural Mechanism of RNA Recognition by the RIG-I-like Receptors. *Immunity* 29:178–181.
57. Wang Q, Carmichael GG. 2004. Effects of length and location on the cellular response to double-stranded RNA. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:432–52, table of contents.
58. Deddouche S, Goubau D, Rehwinkel J, Chakravarty P, Begum S, Maillard P V., Borg A, Matthews N, Feng Q, van Kuppeveld FJM, Reis e Sousa C. 2014. Identification of an LGP2-associated MDA5 agonist in picornavirus-infected cells. *Elife* 2014:1–20.
59. Marcotrigiano J, Gingras A-C, Sonenberg N, Burley SK. 1997. Cocystal Structure of the Messenger RNA 5' Cap-Binding Protein (eIF4E) Bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 89:951–961.
60. Baum A, Sachidanandam R, Garcia-Sastre A. 2010. Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 107:16303–16308.

61. Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Pruijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, Schubert C, Van Der Veen AG, Fujimura T, Rehwinkel J, Iskarpatyoti JA, Barchet W, Ludwig J, Dermody TS, Hartmann G, Reis E Sousa C. 2014. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-triphosphates. *Nature* 514:372–375.
62. Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, Louber J, Brunel J, Grigorov B, Gerlier D, Cusack S. 2011. Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* 147:423–435.
63. Loo Y-M, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, García-Sastre A, Katze MG, Gale M, Jr. 2008. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* 82:335–45.
64. Luo D, Ding SC, Vela A, Kohlway A, Lindenbach BD, Pyle AM. 2011. Structural insights into RNA recognition by RIG-I. *Cell* 147:409–422.
65. Gack MU, Shin YC, Joo C-H, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. 2007. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446:916–920.
66. Myong S, Cui S, Cornish P V, Kirchhofer A, Gack MU, Jung JU, Hopfner K-P, Ha T. 2009. Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science* 323:1070–4.
67. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S. 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 205:1601–10.
68. Loo YM, Gale M. 2011. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* 34:680–692.
69. Runge S, Sparrer KMJ, Lässig C, Hembach K, Baum A, García-Sastre A, Söding J, Conzelmann KK, Hopfner KP. 2014. In Vivo Ligands of MDA5 and RIG-I in Measles Virus-Infected Cells. *PLoS Pathog* 10.
70. Saito T, Hirai R, Loo Y-M, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M. 2007. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:582–7.
71. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. 2010. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci* 107:1512–1517.
72. Plumet S, Duprex WP, Gerlier D. 2005. Dynamics of viral RNA synthesis during

- measles virus infection. *J Virol* 79:6900–8.
73. Childs KS, Randall RE, Goodbourn S. 2013. LGP2 plays a critical role in sensitizing mda-5 to activation by double-stranded RNA. *PLoS One* 8:e64202.
  74. Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, Chu F, Walz T, Hur S. 2013. Structural Basis for dsRNA Recognition, Filament Formation, and Antiviral Signal Activation by MDA5. *Cell* 152:276–289.
  75. Xu H, He X, Zheng H, Huang LJ, Hou F, Yu Z, de la Cruz MJ, Borkowski B, Zhang X, Chen ZJ, Jiang Q-X. 2014. Structural basis for the prion-like MAVS filaments in antiviral innate immunity. *Elife* 3.
  76. Liu B, Gao C. 2018. Regulation of MAVS activation through post-translational modifications. *Curr Opin Immunol* 50:75–81.
  77. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang Q-X, Chen ZJ. 2011. MAVS Forms Functional Prion-like Aggregates to Activate and Propagate Antiviral Innate Immune Response. *Cell* 146:448–461.
  78. Loo Y-M, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, Garcia-Sastre A, Katze MG, Gale M. 2008. Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity. *J Virol* 82:335–345.
  79. Paz S, Sun Q, Nakhaei P, Romieu-Mourez R, Goubau D, Julkunen I, Lin R, Hiscott J. 2006. Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52:17–28.
  80. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437:1167–1172.
  81. Michallet M-C, Meylan E, Ermolaeva MA, Vazquez J, Rebsamen M, Curran J, Poeck H, Bscheider M, Hartmann G, König M, Kalinke U, Pasparakis M, Tschopp J. 2008. TRADD Protein Is an Essential Component of the RIG-like Helicase Antiviral Pathway. *Immunity* 28:651–661.
  82. Großhans J, Schnorrer F, Nüsslein-Volhard C. 1999. Oligomerisation of Tube and Pelle leads to nuclear localisation of Dorsal. *Mech Dev* 81:127–138.
  83. Rich T, Allen RL, Lucas A-M, Stewart A, Trowsdale J. 2000. Pellino-related sequences from *Caenorhabditis elegans* and *Homo sapiens*. *Immunogenetics* 52:145–149.
  84. Jensen LE, Whitehead AS. 2003. Pellino3, a Novel Member of the Pellino Protein Family, Promotes Activation of c-Jun and Elk-1 and May Act as a Scaffolding



- Protein. *J Immunol* 171:1500–1506.
85. Hershko A, Ciechanover A. 1998. THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annu Rev Biochem* 67:425–479.
  86. Malynn BA, Ma A. 2010. Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity* 33:843.
  87. Chen J, Chen ZJ. 2013. Regulation of NF- $\kappa$ B by ubiquitination. *Curr Opin Immunol* 25:4–12.
  88. Haglund K, Di Fiore PP, Dikic I. 2003. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 28:598–604.
  89. Lin C-C, Huoh Y-S, Schmitz KR, Jensen LE, Ferguson KM. 2008. Pellino proteins contain a cryptic FHA domain that mediates interaction with phosphorylated IRAK1. *Structure* 16:1806–16.
  90. Strelow A, Kollwe C, Wesche H. 2003. Characterization of Pellino2, a substrate of IRAK1 and IRAK4. *FEBS Lett* 547:157–161.
  91. Schauvliege R, Janssens S, Beyaert R. 2006. Pellino proteins are more than scaffold proteins in TLR/IL-1R signalling: A role as novel RING E3-ubiquitin-ligases. *FEBS Lett* 580:4697–4702.
  92. Ordureau A, Smith H, Windheim M, Peggie M, Carrick E, Morrice N, Cohen P. 2008. The IRAK-catalysed activation of the E3 ligase function of Pellino isoforms induces the Lys63-linked polyubiquitination of IRAK1. *Biochem J* 409:43.
  93. Goh ETH, Arthur JSC, Cheung PCF, Akira S, Toth R, Cohen P. 2012. Identification of the protein kinases that activate the E3 ubiquitin ligase Pellino 1 in the innate immune system. *Biochem J* 441:339–46.
  94. Butler MP, Hanly JA, Moynagh PN. 2007. Kinase-active interleukin-1 receptor-associated kinases promote polyubiquitination and degradation of the Pellino family: direct evidence for PELLINO proteins being ubiquitin-protein isopeptide ligases. *J Biol Chem* 282:29729–37.
  95. Jiang Z, Johnson HJ, Nie H, Qin J, Bird TA, Li X. 2003. Pellino 1 is required for interleukin-1 (IL-1)-mediated signaling through its interaction with the IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-IRAK-tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) complex. *J Biol Chem* 278:10952–6.
  96. Bennett JA, Prince LR, Parker LC, Stokes CA, de Bruin HG, van den Berge M, Heijink IH, Whyte MK, Sabroe I. 2012. Pellino-1 selectively regulates epithelial cell responses to rhinovirus. *J Virol* 86:6595–604.

97. Choi K-C, Lee YS, Lim S, Choi HK, Lee C-H, Lee E-K, Hong S, Kim I-H, Kim S-J, Park SH. 2006. Smad6 negatively regulates interleukin 1-receptor–Toll-like receptor signaling through direct interaction with the adaptor Pellino-1. *Nat Immunol* 7:1057–1065.
98. Lee YS, Kim JH, Kim S-T, Kwon JY, Hong S, Kim S-J, Park SH. 2010. Smad7 and Smad6 bind to discrete regions of Pellino-1 via their MH2 domains to mediate TGF- $\beta$ 1-induced negative regulation of IL-1R/TLR signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 393:836–843.
99. Chang M, Jin W, Sun S-C. 2009. Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nat Immunol* 10:1089–95.
100. Smith H, Liu X-Y, Dai L, Goh ETH, Chan A-T, Xi J, Seh C-C, Qureshi IA, Lescar J, Ruedl C, Gourlay R, Morton S, Hough J, Mciver EG, Cohen P, Cheung PCF. 2011. The role of TBK1 and IKK $\epsilon$  in the expression and activation of Pellino 1. *Biochem J* 434:537.
101. Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA. 2005. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem* 280:36560–6.
102. Xiao Y, Jin J, Chang M, Chang J-H, Hu H, Zhou X, Brittain GC, Stansberg C, Torkildsen Ø, Wang X, Brink R, Cheng X, Sun S-C. 2013. Peli1 promotes microglia-mediated CNS inflammation by regulating Traf3 degradation. *Nat Med* 19:595.
103. Chang M, Jin W, Chang J-H, Xiao Y, Brittain GC, Yu J, Zhou X, Wang Y-H, Cheng X, Li P, Rabinovich BA, Hwu P, Sun S-C. 2011. The ubiquitin ligase Peli1 negatively regulates T cell activation and prevents autoimmunity. *Nat Immunol* 12:1002–9.
104. Moynagh PN. 2011. Peli1 (rel)ieves autoimmunity. *Nat Immunol* 12:927–929.
105. Jensen LE, Whitehead AS. 2003. Pellino2 activates the mitogen activated protein kinase pathway. *FEBS Lett* 545:199–202.
106. Kim TW, Yu M, Zhou H, Cui W, Wang J, DiCorleto P, Fox P, Xiao H, Li X. 2012. Pellino 2 is critical for Toll-like receptor/interleukin-1 receptor (TLR/IL-1R)-mediated post-transcriptional control. *J Biol Chem* 287:25686–95.
107. Liu Y, Dong W, Chen L, Xiang R, Xiao H, De G, Wang Z, Qi Y. 2004. BCL10 mediates lipopolysaccharide/toll-like receptor-4 signaling through interaction with Pellino2. *J Biol Chem* 279:37436–44.
108. Butler MP, Hanly JA, Moynagh PN. 2005. Pellino3 is a novel upstream regulator of

- p38 MAPK and activates CREB in a p38-dependent manner. *J Biol Chem* 280:27759–27768.
109. Mellett M, Atzei P, Jackson R, O'Neill LA, Moynagh PN. 2011. Mal Mediates TLR-Induced Activation of CREB and Expression of IL-10. *J Immunol* 186:4925–4935.
  110. Huoh YS, Ferguson KM. 2014. The pellino E3 ubiquitin ligases recognize specific phosphothreonine motifs and have distinct substrate specificities. *Biochemistry* 53:4946–4955.
  111. Smith SM, Freeley M, Moynagh PN, Kelleher DP. 2017. Differential modulation of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-mediated TLR2 signaling by individual Pellino proteins. *Helicobacter* 22:1–14.
  112. Murphy MB, Xiong Y, Pattabiraman G, Manavalan TT, Qiu F, Medvedev AE. 2015. Pellino-3 promotes endotoxin tolerance and acts as a negative regulator of TLR2 and TLR4 signaling. *J Leukoc Biol* 98:963–974.
  113. Siednienko J, Jackson R, Mellett M, Delagic N, Yang S, Wang B, Tang LS, Callanan JJ, Mahon BP, Moynagh PN. 2012. Pellino3 targets the IRF7 pathway and facilitates autoregulation of TLR3-and viral-induced expression of type I interferons. *Nat Immunol* 13:1055–1062.
  114. Tzieply N, Kuhn AM, Morbitzer D, Namgaladze D, Heeg A, Schaefer L, von Knethen A, Jensen LE, Brüne B. 2012. OxLDL inhibits LPS-induced IFN $\beta$  expression by Pellino3- and IRAK1/4-dependent modification of TANK. *Cell Signal* 24:1141–1149.
  115. Yang S, Wang B, Humphries F, Jackson R, Healy ME, Bergin R, Aviello G, Hall B, McNamara D, Darby T, Quinlan A, Shanahan F, Melgar S, Fallon PG, Moynagh PN. 2013. Pellino3 ubiquitinates RIP2 and mediates Nod2-induced signaling and protective effects in colitis. *Nat Immunol* 14:927–936.
  116. Aggarwal BB. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745–756.
  117. Yang S, Wang B, Tang LS, Siednienko J, Callanan JJ, Moynagh PN. 2013. Pellino3 targets RIP1 and regulates the pro-apoptotic effects of TNF- $\alpha$ . *Nat Commun* 4:1–19.
  118. LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
  119. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, Sonenberg N, Blenis J. 2007. RAS/ERK Signaling Promotes Site-specific Ribosomal Protein S6 Phosphorylation via RSK and Stimulates Cap-dependent Translation. *J Biol Chem*

- 282:14056–14064.
120. Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, Hershey JWB, Blenis J, Pende M, Sonenberg N. 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J* 25:2781–2791.
  121. Raught B, Peiretti F, Gingras A-C, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, Polakiewicz RD, Sonenberg N, Hershey JW. 2004. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J* 23:1761–1769.
  122. Gavin AC, Schorderet-Slatkine S. 1997. Ribosomal S6 kinase p90rsk and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 46:383–91.
  123. Hauge C, Frödin M. 2006. RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* 119:3021–3.
  124. Kuang E, Fu B, Liang Q, Myoung J, Zhu F. 2011. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4B (EIF4B) by open reading frame 45/p90 ribosomal S6 kinase (ORF45/RSK) signaling axis facilitates protein translation during Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) lytic replication. *J Biol Chem* 286:41171–82.
  125. Kandasamy RK, Vladimer GI, Snijder B, Müller AC, Rebsamen M, Bigenzahn JW, Moskovskich A, Sabler M, Stefanovic A, Scorzoni S, Brückner M, Penz T, Cleary C, Kralovics R, Colinge J, Bennett KL, Superti-Furga G. 2016. A time-resolved molecular map of the macrophage response to VSV infection. *NPJ Syst Biol Appl* 2:16027.
  126. Furr SR, Moerdyk-Schauwecker M, Grzelishvili VZ, Marriott I. 2010. RIG-I mediates nonsegmented negative-sense RNA virus-induced inflammatory immune responses of primary human astrocytes. *Glia* 58:1620–9.
  127. Nikonov A, Mölder T, Sikut R, Kiiver K, Männik A, Toots U, Lulla A, Lulla V, Utt A, Merits A, Ustav M. 2013. RIG-I and MDA-5 Detection of Viral RNA-dependent RNA Polymerase Activity Restricts Positive-Strand RNA Virus Replication. *PLoS Pathog* 9.
  128. Dixit E, Kagan JC. 2013. Intracellular Pathogen Detection by RIG-I-Like Receptors. *Adv Immunol* 117:99–125.
  129. Crill EK, Furr-Rogers SR, Marriott I. 2015. RIG-I is required for VSV-induced

- cytokine production by murine glia and acts in combination with DAI to initiate responses to HSV-1. *Glia* 63:2168–2180.
130. Sun Q, Sun L, Liu HH, Chen X, Seth RB, Forman J, Chen ZJ. 2006. The Specific and Essential Role of MAVS in Antiviral Innate Immune Responses. *Immunity* 24:633–642.
  131. Zenewicz LA, Shen H. 2007. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes Infect* 9:1208–1215.
  132. Ohori M, Takeuchi M, Maruki R, Nakajima H, Miyake H. 2007. FR180204, a novel and selective inhibitor of extracellular signal-regulated kinase, ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374:311–316.
  133. Chi BH, Kim S-J, Seo HK, Seo H-H, Lee S-J, Kwon JK, Lee T-J, Chang IH. 2015. P70S6K and Elf4E Dual Inhibition Is Essential to Control Bladder Tumor Growth and Progression in Orthotopic Mouse Non-muscle Invasive Bladder Tumor Model. *J Korean Med Sci* 30:308.
  134. Wang L, Gout I, Proud CG. 2001. Cross-talk between the ERK and p70 S6 Kinase (S6K) Signaling Pathways. *J Biol Chem* 276:32670–32677.
  135. Fan W, Wang W, Mao X, Chu S, Feng J, Xiao D, Zhou J, Fan S. 2017. Elevated levels of p-Mnk1, p-eIF4E and p-p70S6K proteins are associated with tumor recurrence and poor prognosis in astrocytomas. *J Neurooncol* 131:485–493.
  136. Li Y, He M, Lin W, Xiang Z, Huang J, Xu P, Shi Y, Wang H. 2019. Responses of bladder smooth muscle to the stretch go through extracellular signal-regulated kinase (ERK)/p90 ribosomal S6 protein kinase (p90RSK)/Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Pathway. *NeuroUrol Urodyn* nau.24003.
  137. Rogers GW, Komar AA, Merrick WC. 2002. eIF4A: The godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72:307–331.