

POLSKA AKADEMIA NAUK
INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ IM. L. HIRSZFELDA
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
LABORATORIUM IMMUNOBIOLOGII MIKROBIOMU



Joanna Zyzak

**Wpływ białka adaptorowego Mal na odpowiedź antywirusową
zależną od receptora Toll-podobnego 9**

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR:
DR HAB. INŻ. JAKUB SIEDNIENKO
PROMOTOR POMOCNICZY:
DR INŻ. MAŁGORZATA MITKIEWICZ

WROCLAW 2020

Serdeczne podziękowania składam promotorowi dr hab. inż. Jakubowi Siednienko za opiekę merytoryczną, motywowanie i ogromną życzliwość.

Wyrazy wdzięczności kieruję do promotora pomocniczej dr inż. Małgorzaty Mitkiewicz za nieocenioną pomoc i wsparcie.

Dziękuję także Zespołowi dawnego Laboratorium Białek Sygnałowych za czas poświęcony mi przy realizacji pracy oraz mojej Rodzinie za wyrozumiałość i cierpliwość.

Joanna Zyzak

PRACA WSPÓLFINANSOWANA W RAMACH PROJEKTU **OPUS4 NARODOWEGO**
CENTRUM NAUKI NR UMO-2012/07/B/NZ3/02550.

SPIS TREŚCI

1	Streszczenie	6
2	Wykaz stosowanych skrótów	7
3	Wstęp	9
3.1	Wprowadzenie.....	9
3.2	Receptory Toll-podobne.....	10
3.2.1	Błonowe TLR.....	11
3.2.2	Endosomalne TLR.....	13
3.3	Charakterystyka receptora Toll-podobnego 9	15
3.3.1	Ligandy TLR9	15
3.3.2	Budowa i warianty TLR9	17
3.3.3	Transport i dojrzewanie TLR9	19
3.4	Białka adaptorowe receptorów Toll-podobnych	21
3.4.1	Myddosome.....	22
3.4.1.1	Mal/TIRAP	23
3.4.2	Trifosome.....	26
3.5	Aktywacja szlaku sygnałowego TLR9.....	27
3.6	Nieswoista odpowiedź przeciwwirusowa – interferony typu I.....	30
3.6.1	Mechanizm aktywacji ekspresji <i>IFNβ1</i> w odpowiedzi na infekcje wirusowe	31
3.7	Rola receptorów Toll-podobnych w rozpoznawaniu wirusa opryszczki pospolitej typu 1	32
4	Cel Pracy	35
5	Materiały i metody.....	36
5.1	Materiały	36
5.1.1	Odczynniki chemiczne i reagenty	36
5.1.2	Zestawy gotowe.....	38
5.1.3	Bufory i żele.....	38
5.1.4	Startery do PCR.....	40
5.1.5	Plazmidy.....	41
5.1.5.1	Plazmidy systemu lentiwirusowego.....	41
5.1.5.2	Plazmidy systemu reporterowego	42
5.1.5.3	Plazmidy do koimmunoprecypitacji	42
5.1.6	Kożuszki leukocytarno-platekcyjne.....	42
5.1.7	Linie komórkowe	43
5.1.8	Wirus opryszczki pospolitej typu 1 (Herpes simplex virus-1)	43
5.1.9	Aparatura i akcesoria.....	43
5.2	Metody	44
5.2.1	Otrzymywanie i hodowla komórek	44
5.2.1.1	Hodowle komórkowe.....	44

5.2.1.2	Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej	44
5.2.2	Przygotowywanie plazmidów	45
5.2.2.1	Transformacja bakterii chemikompetentnych.....	45
5.2.2.2	Izolacja plazmidów z bakterii <i>E.coli</i> DH5 α	45
5.2.3	Wyciszanie ekspresji genu <i>TIRAP</i>	46
5.2.3.1	Otrzymywanie wektorów lentiwirusowych	46
5.2.3.2	Transdukcja shRNA.....	46
5.2.4	Analiza ekspresji genów.....	46
5.2.4.1	Stymulacja komórek	46
5.2.4.2	Izolacja RNA	47
5.2.4.3	Odwrotna transkrypcja na matrycy RNA.....	47
5.2.4.4	Amplifikacja swoistych fragmentów DNA metodą PCR	48
5.2.4.5	Amplifikacja swoistych fragmentów DNA metodą PCR w czasie rzeczywistym (qPCR).....	48
5.2.5	Western Blotting	49
5.2.5.1	Stymulacja komórek i przygotowanie lizatów	49
5.2.5.2	SDS-PAGE	49
5.2.5.3	Elektrotransfer białek.....	49
5.2.5.4	Detekcja białek immobilizowanych na błonie nitrocelulozowej.....	50
5.2.6	Analiza reporterowa (Dual-Luciferase Reporter Assay, DLR)	50
5.2.6.1	Transfekcja.....	50
5.2.6.2	Pomiar aktywności lucyferazy.....	51
5.2.7	Test zmiany ruchliwości elektroforetycznej (EMSA)	51
5.2.7.1	Stymulacja komórek i przygotowanie frakcji komórkowych	51
5.2.7.2	Oznaczanie stężenia białka	51
5.2.7.3	Przeprowadzenie testu	52
5.2.8	Test biologiczny do oznaczenia Interferonów typu I	52
5.2.8.1	Przeprowadzenie testu	52
5.2.9	Oznaczanie poziomu TNF α	53
5.2.9.1	Stymulacja komórek	53
5.2.9.2	Przeprowadzenie testu ELISA	53
5.2.10	Badanie oddziaływania białka Mal z białkiem Atg16L.....	53
5.2.10.1	Transfekcja przejściowa komórek i przygotowanie lizatów	54
5.2.10.2	Koimmunoprecypitacja.....	54
5.2.11	Analiza statystyczna	55
6	Wyniki	56

6.1	Badanie roli białka adaptorowego Mal w zależnej od TLR9 odpowiedzi antywirusowej w mikrogleju	56
6.2	Badanie zależnej od Mal regulacji odpowiedzi antywirusowej w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej.....	58
6.3	Badanie wpływu Mal na aktywację kaskad sygnałowych TLR9 w komórkach CHME-5 infekowanych HSV-1	60
6.4	Wpływ nokautu <i>Tirap</i> na transdukcję sygnału zależnego od TLR9 w makrofagach mysich....	61
6.4.1	Potwierdzenie specyficzności nokautu genu <i>Tirap</i> w komórkach BMDM	62
6.4.2	Aktywacja produkcji IFN β i TNF α w odpowiedzi na stymulację komórek BMDM CpG-C....	62
6.5	Badanie wpływu Mal na aktywację kaskad sygnałowych receptora TLR9 aktywowanego CpG-C ODN w komórkach BMDM	64
6.5.1	Kontrola swoistości aktywacji ERK1/2 przez TLR9.....	65
6.5.2	Wpływ zależnej od TLR9 i Mal fosforylacji ERK1/2 na ekspresję <i>Ifnb1</i> i <i>Tnf</i> w komórkach BMDM	65
6.6	Badanie udziału kinazy BTK w zależnej od Mal regulacji aktywności kinaz białkowych ERK1/2	67
6.7	Analiza wpływu kinazy Tpl2 na przekazywanie sygnału od TLR9	68
6.8	Badanie roli białka Mal w procesie autofagii.....	69
6.8.1	Udział PI3K w aktywowanej przez TLR9 ekspresji <i>IFNBI</i> oraz <i>TNF</i>	69
6.8.2	Oddziaływanie białka adaptorowego Mal z białkiem Atg16L1	71
6.9	Badanie udziału białka Mal w aktywacji czynników transkrypcyjnych indukowanych przez TLR9	71
6.9.1	Analiza reporterowa aktywacji regionu promotorowego genu <i>IFNBI</i>	71
6.10	Badanie udziału białka Mal w regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych w makrofagach mysich.....	74
6.10.1	Badanie translokacji jądrowej czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i jej wpływu na indukcję cytokin	74
6.10.2	Analiza wpływu białka Mal na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B	76
7	Podsumowanie wyników	78
8	Dyskusja wyników	79
9	Wnioski	90
10	Streszczenie w języku angielskim	92
11	Literatura	93

1 STRESZCZENIE

Receptory Toll-podobne (TLR) są ważną grupą białek zaangażowanych do uruchomienia mechanizmów nieswoistej odpowiedzi odpornościowej. Wiążąc struktury zwane wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (PAMP), aktywują szlaki sygnałowe prowadzące do indukcji ekspresji, m.in. cytokin prozapalnych i interferonów. TLR są receptorami zakotwiczonymi w błonie komórkowej lub w membranach endosomów. Receptory występujące w endosomach odpowiadają głównie za rozpoznawanie kwasów nukleinowych patogenów internalizowanych na drodze fagocytozy lub endocytozy. Należy do nich m.in. TLR9 wiążący fragmenty bakteryjnego i wirusowego DNA bogate w niemetylowane dinukleotydy cytozyno-guaninowe (CpG). Prawidłowe rozpoznanie liganda uzależnione jest od złożonego procesu dojrzewania receptora i prowadzi do rekrutacji kompleksu białek zwanego Myddosome. Do niedawna sugerowano, że Myddosome rekrutowany jest do TLR9 dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu domen TIR receptora i białka MyD88, wykluczając udział białek adaptorowych w tym procesie. Błonowe receptory z rodziny TLR, m.in. TLR2 i TLR4, kotwiczące Myddosome angażują do przekazania sygnału białko adaptorowe Mal, którego udział w kaskadach zależnych od endosomalnych TLR był wykluczany m.in. ze względu na preferencyjne wiązanie PI(4,5)P₂ obecnego w przewodzie w błonie komórkowej.

Przekazanie sygnału od Myddosome'u na dalsze białka szlaku zależnego od TLR9 pozwala na aktywację czynników transkrypcyjnych, a mianowicie NF-κB, AP-1 oraz czynników z rodziny IRF zapoczątkowujących ekspresję genów kodujących repertuar cytokin prozapalnych, takich jak TNFα czy IL-6, a także interferonów typu I.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu białka Mal na regulację szlaku sygnałowego inicjowanego przez endosomalny receptor TLR9.

Wyniki badań pozwoliły na identyfikację mechanizmu regulacji szlaku sygnałowego endosomalnego receptora TLR9 przez białko Mal, które do tej pory łączone było głównie z receptorami zakotwiczonymi w błonie komórkowej. W pierwszym etapie ustalono, że aktywacja TLR9 zarówno przez wirus HSV-1, jak i syntetyczne CpG prowadzi do ekspresji *IFNB1* i *TNF* na drodze zależnej od Mal. Obserwacje sugerują, że białko to bierze udział w regulacji fosforylacji kinaz z rodziny MAP, a mianowicie ERK1/2. Obecność białka Mal wpływa na regulację niekanonicznej kaskady sygnałowej NF-κB aktywując translokację cytoplazmatyczno-jądrową heterodimeru c-Rel/p50, co manifestuje się obniżoną ekspresją genów kodujących IFNβ i TNFα w komórkach z nokautem genu dla Mal. Ponadto zidentyfikowano nową interakcję białka Mal z białkiem Atg16L1, zaangażowanym w proces autofagii.

Z uwagi na udział receptora TLR9 w wielu procesach chorobowych m.in. w przebiegu zapalenia mózgu związanego z infekcją wirusem HSV-1, ale także w przebiegu chorób wynikających z autoagresji, takich jak toczeń rumieniowaty układowy i łuszczyca, ważnym wydaje się poznanie nowych mechanizmów regulacji wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, w tym odpowiedzi zależnej od TLR9, co umożliwi rozwój nowych terapii antywirusowych.

2 WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

3-MA	3-metyloadenina, inhibitor PI3K
AP-1	ang. <i>Activator Protein 1</i> , czynnik transkrypcyjny
Atg	ang. <i>Autophagy related</i> , gen/białko związane z autofagią
BMDM	ang. <i>Bone Marrow Derived Macrophages</i> , unieśmiertelnione makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego
BTK	ang. <i>Bruton's Tyrosine Kinase</i> , kinaza tyrozynowa Brutona
CD	ang. <i>Cluster of Differentiation</i> , kompleks różnicowania
CHME-5	linia ludzkich embrionalnych komórek mikroglejowych
CpG	dinukleotyd cytozyno-guaninowy
DC	ang. <i>Dendritic Cells</i> , komórki dendrytyczne
ER	ang. <i>Endoplasmic Reticulum</i> , retikulum endoplazmatyczne
ERK	ang. <i>Extracellular signal Regulated Kinases</i> , kinazy białkowe regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi
FR180204	inhibitor kinaz ERK1/2
HA	ang. <i>Hemagglutinin</i> , metka hemaglutyniny
HSE	łac. <i>Herpes Simplex-1 Encephalitis</i> , opryszczkowe zapalenie mózgu
HSV-1	łac. <i>Herpes Simplex Virus 1</i> , wirus opryszczki pospolitej typu 1
IFN	interferon
INH-1 ODN	oligonukleotyd inhibitorowy; inhibitor TLR9
IRAK	ang. <i>Interleukin-1 Receptor (IL-1R) Associated Kinase</i> , Rodzina kinaz związanych z receptorem dla IL-1
IRF	ang. <i>Interferon Regulatory Factor</i> , czynnik transkrypcyjny regulujący aktywację ekspresji genu kodującego interferon
JSH-23	inhibitor translokacji jądrowej czynnika NF-κB
LPS	lipopolisacharyd
LRR	ang. <i>Leucin Reach Repeats</i> , domena bogata w powtórzenia leucynowe
Mal	ang. <i>MyD88-adaptor like</i> ; białko adaptorowe
MAPK	ang. <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> , kinaza białkowa aktywowana mitogenami
MOI	ang. <i>Multiplicity of infection</i> , ilość wirionów infekujących komórkę
MyD88	ang. <i>Myeloid Differentiation primary response 88</i> ; białko adaptorowe receptorów TLR
NF-κB	ang. <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> ; jądrowy czynnik κB, czynnik transkrypcyjny
ODN	oligodeoksynukleotyd
PI3K	ang. <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i> , kinaza fosfatidyloinozytolu
PI(3)P	ang. <i>Phosphatidylinositol 3-Phosphate</i> , fosfatidyloinozytolo-3-fosforan
PI(4,5)P₂	ang. <i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> , fosfatidyloinozytolo-4,5-bisfosforan
PAMP	ang. <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> , wzorce molekularne związane z patogenami
PBMC	ang. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PRD	ang. <i>Positive Regulatory Domain</i> , pozytywna domena regulacyjna
PRR	ang. <i>Pattern Recognition Receptors</i> , receptory rozpoznające wzorce

- RAGE** ang. *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*, receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji
- shRNA** ang. *short hairpin RNA*, krótkie interferujące RNA o strukturze spinki do włosów
- SNP** ang. *Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfizm punktowy
- TIR** ang. *Toll/interleukin-1 receptor (TIR) homology domain*, domena homologii Toll/receptora dla Il-1
- TNF α** ang. *Tumor Necrosis Factor α* , czynnik martwicy nowotworu, czynnik transkrypcyjny
- TRAF6** ang. *TNF Receptor Associated Factor*, czynnik 6 związany z receptorem TNF
- TRIF** ang. *TIR domain-containing adapter inducing IFN β* , białko adaptorowe posiadające domenę TIR
- TLR** ang. *Toll-like Receptor*, receptor Toll-podobny

3 WSTĘP

3.1 WPROWADZENIE

Badania nad mechanizmami odpowiedzi odpornościowej obfitowały w wiele przełomów i zwrotów akcji. Teoria komórkowa inspirowana odkryciem zjawiska fagocytozy przez Miecznikowa została odsunięta na dalszy plan po odkryciu zjawiska selekcji klonalnej limfocytów, które wyznaczyło nowe trendy w poszukiwaniu rozwiązań dotyczących zagadnień odpowiedzi odpornościowej.

Ponowne zainteresowanie mechanizmami wrodzonej odpowiedzi odpornościowej przyniosła nowatorska, choć początkowo ignorowana teoria Charles'a A. Janeway'a Jr., która połączyła odpowiedź pierwotną z indukcją odpowiedzi nabytej (1). W teorii tej opisane zostały hipotetyczne receptory, nazwane receptorami rozpoznającymi wzorce (ang. *Pattern Recognition Receptors*, PRR), odpowiadające za wiązanie wzorców molekularnych związanych z patogenami (ang. *Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMP), niezmiennych ewolucyjnie struktur charakterystycznych dla mikroorganizmów i wirusów. Są to najczęściej takie elementy ich budowy, których obecność warunkuje funkcjonowanie bądź przeżycie, przy czym nie są prezentowane w organizmie gospodarza. Mechanizm rozróżnienia „swojego” od „obcego” (ang. *self/ nonself discrimination*) został opisany jako punkt krytyczny w indukcji procesów odpornościowych (2).

Teoria Janeway'a odnosiła się do istnienia pierwotnych układów odpornościowych u bezkręgowców, które wydajnie radziły sobie z rozpoznawaniem i eliminacją szerokiej gamy pasożytów bez angażowania nabytej odpowiedzi odpornościowej. Zidentyfikowane u muszki owocowej białko Toll, początkowo wiązane jedynie z polaryzacją grzbietowo-brzuszną, okazało się pełnić funkcję w odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko grzybom i bakteriom (3, 4).

Białko Toll stało się punktem wyjścia do poszukiwań cząsteczek pełniących podobną rolę w odpowiedzi odpornościowej kręgowców, co doprowadziło do potwierdzenia teorii Janeway'a i opisanie ciągle rosnącej rodziny receptorów PRR.

W toku wieloletnich badań nad mechanizmami wrodzonej odpowiedzi odpornościowej okazało się, że są one wysoce skomplikowane i angażują wiele szlaków sygnałowych. Zadaniem receptorów PRR jest szybka identyfikacja patogenu, uruchomienie kaskady sygnałowej prowadzącej do rozwoju odpowiedzi zapalnej lub procesów przeciwwirusowych, ale także mobilizacja komórek odpowiedzialnych za rozwój nabytej odpowiedzi odpornościowej, takich jak limfocyty T i B.

3.2 RECEPTORY TOLL-PODOBNE

Receptory Toll-podobne (ang. *Toll-like Receptors*, TLR) stanowią główną i najlepiej poznaną grupę receptorów rozpoznających wzorce.

Ludzkie białko Toll, hToll, nazwane później TLR4, zostało zidentyfikowane w 1997 roku przez Ruslana Medzhitova i współpracowników dzięki obecności charakterystycznych cech – homologii do białka Toll pochodzącego z *Drosophila melanogaster* oraz zdolności do aktywacji, kluczowego podczas inicjacji procesu zapalnego, czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (5, 6).

Rodzina TLR składa się z 13 członków: TLR1-13, przy czym w organizmie ludzkim prezentowanych jest ich 10 (7).

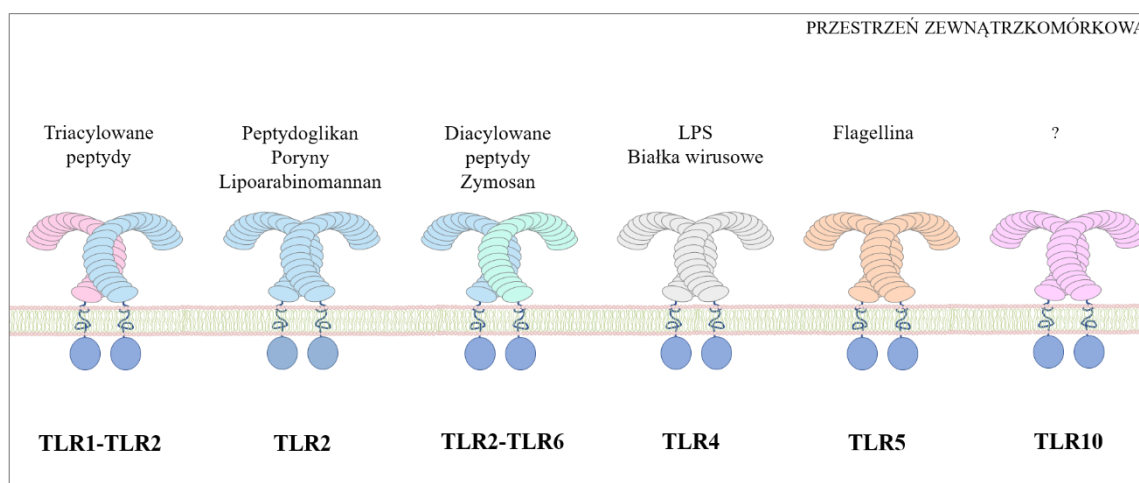
Geny kodujące receptory Toll-podobne ulegają ekspresji w różnych typach komórek, m.in. w komórkach dendrytycznych, makrofagach, limfocytach T i B, fibroblastach.

Umieszczenie TLR w obrębie komórki pozwala na zaliczenie tych receptorów do jednej z dwóch grup: receptorów kotwiczonych do błony komórkowej lub związanych z endosomem. Dzięki obecności TLR zarówno na powierzchni komórki, jak i w jej wnętrzu, możliwe jest rozpoznanie całego spektrum komponentów prezentowanych przez patogen. Receptory obecne w błonie komórkowej aktywowane są strukturami białkowymi, lipidowymi bądź cukrowymi eksponowanymi na powierzchni mikroorganizmów i wirusów, natomiast endosomalne TLR funkcjonują jako sensory zinternalizowanych kwasów nukleinowych, których dostępność zależna jest od wcześniejszej degradacji patogenu we wnętrzu pęcherzyka endosomalnego.

Receptory Toll-podobne są białkami transbłonowymi I typu, posiadającymi trzy charakterystyczne domeny: domenę zewnątrzkomórkową (ang. *Extracellular Domain*, ECD), skierowaną do przestrzeni międzykomórkowej lub do wnętrza endosomu, zawierającą powtórzenia bogate w leucynę (ang. *Leucine-Rich Repeat*, LRR), domenę transmembranową (ang. *Transmembrane Domain*, TMD) posiadającą strukturę pojedynczej α -helisy oraz domenę cytoplazmatyczną ICD (ang. *Intracellular Domain*), wykazującą homologię do receptora IL-1 (ang. *Toll/IL-1 receptor*, TIR) (8). Domena EC odpowiedzialna jest za wiązanie liganda na zewnątrz komórki bądź we wnętrzu pęcherzyka endosomalnego, natomiast ICD, ze względu na zdolność oddziaływania z białkami adaptorowymi, uczestniczy w przekazywaniu sygnału na kolejne białka kaskady znajdujące się w przestrzeni cytoplazmatycznej.

3.2.1 Błonowe TLR

Błonowe receptory Toll-podobne wiążą cały wachlarz struktur obecnych u wirusów, mikroorganizmów oraz pierwotniaków bytujących w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Rys. 1.). Zdolność TLR do tworzenia heterodimerów dodatkowo zwiększa możliwość rozpoznania patogenów przez te receptory.



Rys. 1. Błonowe receptory Toll-podobne i ich ligandy

Pionierskie badania nad receptorami Toll-podobnymi doprowadziły do identyfikacji TLR4, obecnie najlepiej poznanego wśród wszystkich TLR (5). Identyfikacja głównego agonisty TLR4, jakim jest lipopolisacharyd została uhonorowana Nagrodą Nobla, którą w 2011 roku otrzymali Bruce A. Beutler i Jules A. Hoffmann (9-11).

TLR4 rozpoznaje ligand w kompleksie złożonym z kilku białek pomocniczych, ponadto receptor ten jest wyjątkowym w swej rodzinie, gdyż po związaniu liganda na powierzchni komórki i uruchomieniu jednego ramienia kaskady sygnałowej jest internalizowany do endosomu, skąd aktywuje kolejne białka. Takie właściwości tego receptora były przyczyną wielu niepowodzeń w poszukiwaniu jego agonisty.

Aktywacja TLR4 wymaga związania cząsteczki LPS przez białko surowicy krwi LBP (ang. *LPS-binding protein*) (12) i dostarczenia jej do cząsteczki CD14 (ang. *Cluster of Differentiation 14*) (13), która ma zdolność do interakcji z różnymi molekułami będącymi PAMP oraz ich syntetycznymi analogami, oprócz LPS są to m.in. peptydoglikany, Pam3CSK4, polyI:C oraz CpG DNA (14). Ponadto w przekazaniu sygnału od receptora uczestniczy białko MD2, warunkujące translokację TLR4 ze struktur Golgiego, wiązanie liganda oraz dimeryzację receptora (15-17).

Mimo, że większość badań dotyczących TLR4 skupia się na mechanizmach związanych z rozpoznawaniem LPS, istnieje całe spektrum molekuł różnego pochodzenia mających potencjał do aktywacji tego receptora. Są to m.in.: komponenty wirusowe jak białko fuzyjne wirusa RS (ang. *Respiratory Syncytial Virus*) (18) czy białka wirusów mysich MMT (ang. *Mouse Mammary Tumor Virus*) i MML (ang. *Moloney Murine Leukemia Virus*) (19), składniki ścian komórkowych drożdży jak mannany *Candida albicans* (20), a także glikoinozytolofosfolipidy obecne u pasożytujących pierwotniaków z rodzaju *Trypanosoma* (21). Interesującym jest też fakt, że w niektórych przypadkach TLR4 może rozpoznawać molekuły endogenne jak białka szoku cieplnego (HSP22, HSP60 i HSP70) (22-24) oraz białko HMGB1 uwalniane podczas uszkodzenia komórek (25). Ta właściwość receptora TLR4 spowodowała wzrost zainteresowania potencjalnym udziałem TLR4 w rozwoju chorób z autoagresji.

Kolejnym błonowym receptorem Toll-podobnym jest TLR2. Receptor ten rozpoznaje cały repertuar ligandów w zależności od partnera, z którym tworzy dimer. Wykazano, że TLR2 może występować w formie homodimeru lub też oddziaływać z TLR1 i TLR6. Spośród aktywatorów TLR2 można wymienić peptydoglikan bakterii Gram+, poryny *Neisseria* czy też lipoarabinomannan mykobakterii (26), w kompleksach z TLR1 rozpoznawać może triacylowane lipopetydy (27), natomiast z TLR6 diacylowane peptydy bakteryjne (28), a także zymosan pochodzący z *Saccharomyces cerevisiae* (29). Ponadto TLR2 ma zdolność do wykrywania komponentów wirusowych, takich jak hemaglutynina wirusa odry (30).

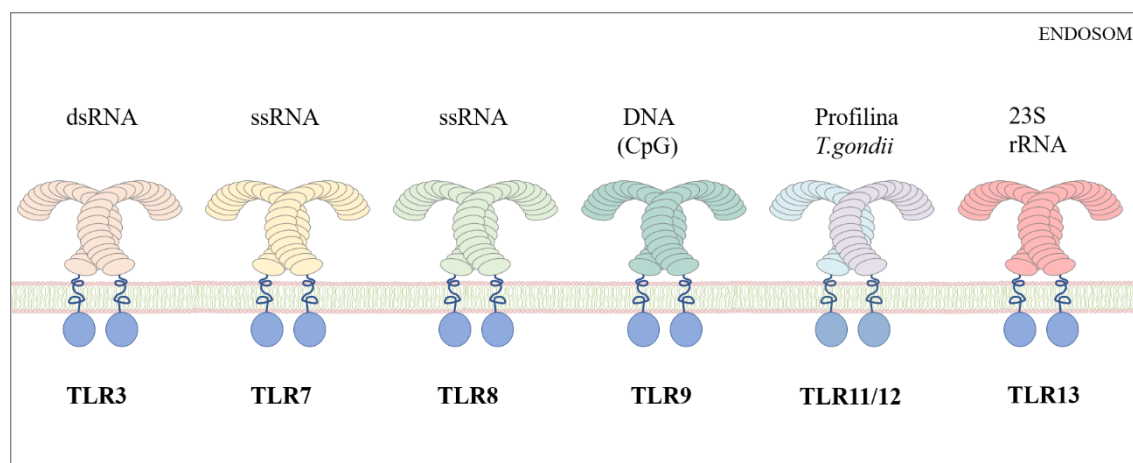
TLR5 rozpoznaje flagelinę będącą białkiem strukturalnym wici bakterii (31). TLR5 występuje m.in. w komórkach układu odpornościowego, ale też w nabłonku jelit i w niewielkiej ilości w nabłonku układu oddechowego. Wykazano, że TLR5 ma potencjał do aktywacji odpowiedzi zapalnej zarówno po wykryciu bakterii komensalnych, jak i chorobotwórczych. Z tego względu specyficzne lokowanie TLR5 w obrębie komórki, a mianowicie w błonie bazolateralnej, zapobiega jego nieprawidłowej aktywacji. TLR5 wykrywa te bakterie, które próbują wydostać się ze światła jelita i uniemożliwia ich rozprzestrzenianie się w organizmie (32). Wykazano również powiązanie pomiędzy TLR5, a patogenezą choroby Alzheimera, gdyż rzadkie warianty receptora wynikające z alternatywnego składowania mRNA obniżały ryzyko zapadalności na tę chorobę. Ponadto peptydy blokujące ektodomenę TLR5 powodowały znaczne obniżenie akumulacji amyloidu beta u myszy, co oznacza, że receptor ten może być celem terapeutycznym w walce z rozwojem choroby Alzheimera (33).

Ostatnim z repertuaru błonowych TLR jest TLR10. Receptor ten został zidentyfikowany dość dawno, bo w 2001 roku, jednakże poszukiwania jego liganda długo nie przynosiły rezultatu, dlatego określany był mianem receptora sierocego. TLR10 jest filogenetycznie spokrewniony z TLR1 i TLR6, a jego ekspresja jest obserwowana głównie w narządach i komórkach układu odpornościowego (34). Postulowano, że za aktywację tego receptora odpowiada wirusowe dsRNA (35), jednakże jego udział obserwowano również w rozpoznaniu

Listeria monocytogenes (36). Zgodnie z najnowszymi badaniami ligandem dla tego receptora może być glikoproteina pochodząca od wirusa HIV gp41, ponadto obserwowano niemal stukrotnie wyższą ekspresję genu TLR10 u osób zakażonych HIV (37). Ze względu na rozbieżności, jakich dostarczają kolejne badania mające na celu identyfikację liganda dla TLR10, istotnym wydaje się doprecyzowanie roli tego receptora w aktywacji odpowiedzi odpornościowej.

3.2.2 Endosomalne TLR

W błonie pęcherzyków endosomalnych kotwiczone są cztery receptory Toll-podobne: TLR3, TLR7, TLR8 oraz TLR9. Każdy z tych receptorów jest odpowiedzialny za specyficzne rozpoznanie określonego typu kwasów nukleinowych, pochodzącego najczęściej ze zdegradowanych w endosomie patogenów (Rys. 2.).



Rys. 2. Endosomalne TLR i ich ligandy

TLR3 został scharakteryzowany jako drugi z receptorów dla dwuniciowego RNA (dsRNA, ang. *double stranded RNA*), gdy okazało się, że komórki z nokautem genu kodującego PKR (ang. *Protein Kinase RNA-activated*), będącą znanym sensorem dsRNA odpowiadają na jego syntetyczny analog, polyI:C (38, 39). Naturalnym aktywatorem TLR3 są kwasy nukleinowe pochodzące od wirusów, stanowiące zarówno ich genom, jak też będące formami przejściowymi powstałymi podczas replikacji (26). Z tego względu udział TLR3 odnotowano w rozpoznawaniu wirusów dsRNA, ssRNA, ale także DNA. Początkowo sądzono, że, podobnie jak inne receptory tej rodziny, TLR3 przekazuje sygnał poprzez adaptor MyD88 (39). Badania Yamamoto i wsp. oraz Oshiumi pokazały, że TLR3, jako jedyny spośród receptorów Toll-podobnych, przekazuje sygnał na drodze MyD88 niezależnej, a zależnej od białka adaptorowego TRIF/TICAM-1 (ang. *TIR domain-containing adapter inducing IFN β /Toll-interleukin 1 receptor domain (TIR)-containing adaptor molecule*) (40, 41).

Drugim wariantem wirusowych kwasów nukleinowych rozpoznawanym przez TLR jest ssRNA (ang. *single stranded RNA*), stanowiący ligand dla TLR7 i 8.

TLR7/8, które nie występują tak powszechnie jak TLR3, zostały odkryte w pDC (ang. *plasmacytoid Dendritic Cells*) i mDC (ang. *myeloid Dendritic Cells*). TLR7 początkowo został zidentyfikowany jako receptor rozpoznający pochodne imidazochinoliny, a następnie ssRNA pochodzenia wirusowego. Pokazano, że mysz TLR7 i ludzki TLR8 rozpoznają bogate w guaninę i uracyl ssRNA wirusów, takich jak: HIV, VSV czy wirus grypy A (42-44). TLR7 może również wykrywać cząsteczki cytozolowego RNA na drodze autofagii. Proces przebiega podobnie do endocytozy, gdyż RNA otaczane jest przez pęcherzyki, które następnie dostarczają go do endosomu (43).

Wśród endosomalnych TLR zostały opisane TLR11 i TLR12, które różnią się od pozostałych tym, że rozpoznają ligand białkowy profilinę (45, 46). Geny kodujące te receptory są w 96% homologiczne i dodatkowo wykazują podobieństwo do innego TLR rozpoznającego białka, a mianowicie do TLR5. TLR11 i 12 występują w formie heterodimeru i pośredniczą w indukowaniu odpowiedzi skierowanej przeciwko pierwotniakom m.in. *Toxoplasma gondii* manifestującej się wydzielaniem IFN α i IL-12 przez pDC, a następnie wzmożoną aktywacją komórek NK i produkcją IFN γ (46, 47). Zupełnie odmienną rolę TLR11 i 12 pełnią w odpowiedzi na *Leishmania major*. Wykazano bowiem, że wyciszenie ekspresji genów dla tych receptorów u myszy prowadziło do uruchomienia mechanizmów odpowiedzi komórkowej zależnych od limfocytów Th1 i wydzielanego przez nie IFN γ , co skutkowało lepszą przeżywalnością i eliminacją pasożytów z organizmu. Mechanizm leżący u podstaw tego fenomenu nie jest jeszcze do końca poznany, jednakże najprawdopodobniej wiąże się z sekwencyjną aktywacją receptorów rodziny TLR, najpierw TLR2, a następnie dimeru TLR11/12 (48).

Stosunkowo niedawno, bo w 2011 r. został odkryty kolejny endosomalny receptor z rodziny Toll-podobnych, TLR13. Ekspresję genu *Tlr13* wykazują jedynie komórki mysie, a nokaut tego genu powodował wysoką podatność komórek na zakażenia wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) (49). Dalsze badania dotyczące TLR13 wykazały, że innym ligandem dla tego receptora jest bakteryjne RNA (50), a dokładnie podjednostka 23S rybosomalnego RNA, będąca miejscem wiązania antybiotyków makrolidowych, linkozamidów oraz streptogramin (MLS). Metylacja tej podjednostki warunkuje oporność bakterii na antybiotyki grupy MLS. Wykazano, że jedynie niemodyfikowana podjednostka 23S rRNA ma zdolność aktywowania odpowiedzi zależnej od TLR13 (51).

3.3 CHARAKTERYSTYKA RECEPTORA TOLL-PODOBNEGO 9

3.3.1 Ligandy TLR9

TLR9 został zidentyfikowany w 2000 roku jako endosomalny receptor wiążący bakteryjne DNA, bogate w niemetylowane sekwencje CpG (52).

Potencjał przeciwnowotworowy i immunostymulujący DNA bakterii zaobserwowano po raz pierwszy w 1984 r. podczas badań frakcji DNA pochodzącej ze szczepionki przeciw gruźlicy – BCG (Bacille Calmette-Guérin), otrzymanej z *Mycobacterium bovis* (53). Dalsze badania wykazały, że stymulacja *in vivo* wyekstrahowanym z BCG DNA indukuje wytwarzanie interferonu typu I i aktywuje komórki NK (53, 54). Ustalono, że za te właściwości odpowiadają charakterystyczne palindromowe motywy nukleotydów z występującym centralnie dinukleotydem cytozyno-guaninowym (55).

Postulowano, że aktywacja proliferacji limfocytów B przez oligonukleotydy zawierające motywy CpG uzależniona jest od metylacji cytozn oraz specyficznej sekwencji nukleotydowej. Największy potencjał do aktywacji komórek posiadała niemetylowana sekwencja CpG otoczona przez dwie puryny na końcu 5' oraz dwie pirymidyny na końcu 3' (56).

Niemetylowane dinukleotydy CpG powszechne są u bakterii i wirusów natomiast w genomach kręgowców występują ze znacznie niższą częstością. Szacuje się, że ilość dinukleotydów CpG w DNA organizmów wyższych jest zredukowana do ¼ w porównaniu z DNA bakterii. Skupiska niemetylowanych dinukleotydów CpG, zwane wyspami CpG obecne są w regionach regulatorowych około 70% promotorów genów i odpowiadają za powstawanie dostępnej transkrypcyjnie postaci chromatyny (57). Niska częstość występowania motywów CpG w genomach kręgowców, metylacja reszt cytozyny, a także ograniczenia występowania wysp CpG do konkretnych przedziałów komórki pozwalają na rozróżnienie DNA patogenu od własnego materiału genetycznego (56).

Bazując na danych sugerujących, że mechanizm aktywacji odpowiedzi odpornościowej przez CpG angażuje białka MyD88 i TRAF6, wykorzystywane do transdukcji sygnału przez receptory Toll-podobne, skupiono się na poszukiwaniach receptora należącego do tej rodziny, który mógłby wiązać DNA (58). Stosując narzędzia bioinformatyczne wytypowano potencjalny receptor, który oznaczono jako TLR9. Natomiast wykorzystanie myszy z nokautem genu *Tlr9* pozwoliło na jednoznaczne potwierdzenie roli tego receptora w rozpoznawaniu oligonukleotydów bogatych w sekwencje CpG. Delecja *Tlr9* powodowała zahamowanie proliferacji splenocytów oraz zaburzenia ekspresji MHC klasy II w limfocytach B. Ponadto, nokaut *Tlr9* warunkował oporność myszy na letalne dawki CpG przy jednoczesnym braku sekrecji cytokin prozapalnych (52).

Jak już wspomniano naturalnym ligandem dla TLR9 jest DNA pochodzące od bakterii i wirusów. Receptor ten pośredniczy w aktywacji odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciw wirusom z rodziny *Herpesviridae* m.in. Herpes simplex I i II (59, 60), CMV (61) i Epstein-Barr (62). Wirus Epstein-Barr jest czynnikiem etiologicznym nowotworu zwanego chłoniakiem Burkitta. Endemiczna postać nowotworu występuje głównie wśród dzieci i młodzieży z terenów Afryki. Pokazano, że do rozwoju chłoniaka Burkitta dochodzi na skutek jednoczesnego zakażenia EBV i zarodźcem sierpowatym (*Plasmodium falciparum*). W patogenezie tego nowotworu ważną rolę odgrywa receptor TLR9. Wykazano, że receptor ten wiążąc hemozoinę uwalnianą przez *P. falciparum* może aktywować niekanoniczny szlak sygnałowy, który hamuje replikację EBV, co prowadzi do ustanowienia zakażenia latentnego i uruchomienia onkogenego potencjału wirusa (63-65). Ponadto zaobserwowano też, że w konkretnych warunkach TLR9 może błędnie rozpoznawać endogenne DNA i uczestniczyć w rozwoju chorób z autoagresji. W przypadku łuszczycy obserwuje się nadprodukcję peptydu LL37 przez keratynocyty i neutrofile. Peptyd ten tworzy kompleksy z DNA pochodzącym z komórek nekrotycznych ochraniając je przed działaniem nukleaz, umożliwiając tym samym jego dostarczenie do endosomów oraz rozpoznanie przez TLR9 (66). Z kolei inny mechanizm może wiązać się z rozwojem toczenia rumieniowatego układuowego, w którym to endogenne DNA łączy się z białkiem HMGB-1 i w postaci kompleksu z autoprzeciwciałami jest rozpoznawane przez receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji (ang. *Receptors for Advanced Glycation End products*, RAGE) obecne na powierzchni komórek dendrytycznych, co następnie umożliwia aktywację TLR9 w endosomie (67).

Odkrycie właściwości immunostymulujących DNA bogatego w niemetylowane dinukleotydy CpG dało początek badaniom związanym z jego potencjalnym zastosowaniem jako adiuwantu szczepionkowego (68). Obecnie trwają badania przedkliniczne i kliniczne dotyczące wykorzystania syntetycznych oligonukleotydów bogatych w CpG zarówno w szczepionkach, jak i w terapii przeciwnowotworowej. Wykazano ich pozytywny wpływ na modulowanie odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciw m.in. malarii, zapaleniu wątroby typu B oraz zapaleniu płuc. Korzystny efekt terapii antynowotworowej w połączeniu z niemetylowanymi motywami CpG obserwowano w przypadku czerniaka, raka piersi, mięsaków i glejaków (69).

Badania dotyczące syntetycznych CpG ODN skupiały się na poznaniu takich ich cech, które pozwoliłyby na regulowanie siły i specyficzności odpowiedzi odpornościowej przez różne typy komórek. Już w roku 1995 Krieger i wsp. wskazywali, że modyfikacje wprowadzone w strukturę oligonukleotydów bogatych w CpG mogą zmieniać ich potencjał immunostymulujący. Obserwowano, że stymulacja limfocytów B oligonukleotydami, w których internukleotydowe wiązania fosfodiesterowe zastąpiono wiązaniami tiofosforanowymi powodowała znacznie wyższą aktywację proliferacji komórek i sekrecję przez nie immunoglobulin (56).

Syntetyczne CpG-ODN ze względu na strukturę podzielić można na cztery główne typy: A, B, C i P. Typ A posiada centralnie położoną strukturę palindromową, z wiązaniami fosfodiestrowymi, otoczoną dwoma ogonami poli(G) o wiązaniach tiofosforanowych. Palindrom warunkuje wewnętrzną hybrydyzację oligonukleotydu, natomiast wystające ogony poli(G) ułatwiają wnikanie do wnętrza komórki i determinują tworzenie agregatów. (70, 71). CpG-B ODN jest oligonukleotydem liniowym, który nie ma zdolności do tworzenia większych kompleksów. Ponadto wszystkie internukleotydowe wiązania są wiązaniami tiofosforanowymi, co czyni tę strukturę całkowicie odporną na degradację przez nukleazy (72, 73). CpG-C ODN łączy cechy zarówno CpG-A i CpG-B, a mianowicie posiada strukturę palindromową i tiofosforanowe wiązania internukleotydowe (74). Typ P posiada z kolei dwa motywy palindromowe pozwalające na tworzenie złożonych kompleksów (75).

Motywy CpG rozpoznawane są przez TLR9 w konkretnym kontekście nukleotydowym, ale także w zależności od organizmu, w którym prezentowany jest receptor. Komórki ludzkie aktywowane są powtórzeniami CG z centralną sekwencją GTCGTT, natomiast myszy TLR9 rozpoznaje motywy GACGTT (76).

Struktura oligonukleotydu i obecny w nim motyw CpG determinują zarówno typ i siłę indukowanej przez TLR9 odpowiedzi odpornościowej.

3.3.2 Budowa i warianty TLR9

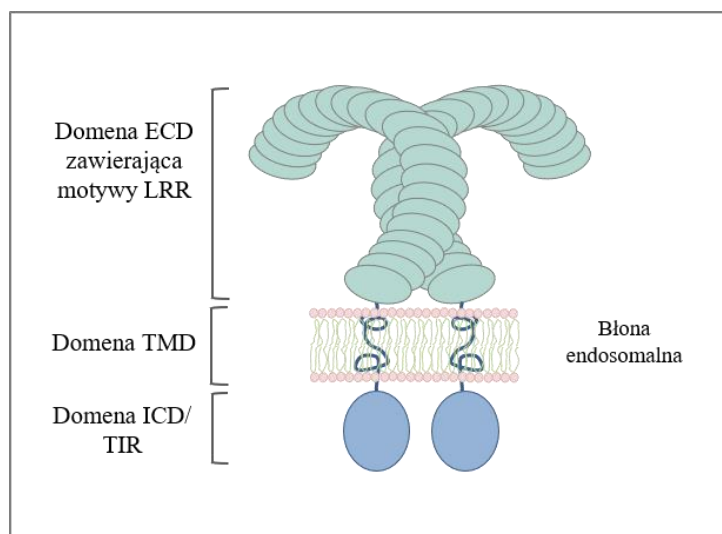
Gen ludzkiego TLR9 (*TLR9*) składa się z dwóch eksonów i znajduje się na chromosomie 3 w pozycji 3p21.3. Dwie niezależne grupy badawcze opisały łącznie pięć form tego receptora będących efektem alternatywnego składania mRNA: TLR9A-TLR9E (10, 77).

Warianty różnią się między sobą długością sekwencji aminokwasowej oraz funkcjonalnością, jednakże posiadają wspólny region zbudowany z 975 aminokwasów. Wariant A jest kodowany przez oba eksony i jest białkiem konwencjonalnym, złożonym z 1032 reszt aminokwasowych o łącznej masie cząsteczkowej około 120 kDa, krótsze formy B i E są nieaktywne, natomiast C i D, wydłużone o odpowiednio 23 i 24 reszty aminokwasowe, stanowią funkcjonalne receptory (78).

U ludzi gen kodujący TLR9 ulega ekspresji w śledzionie, węzłach chłonnych, szpiku kostnym, a także komórkach krwi, przy czym ekspresja izoform funkcjonalnych jest zmienna w zależności od typu komórek (77). Forma A podlega najsilniejszej ekspresji w limfocytach B, natomiast w limfocytach T przeważa forma C (78).

TLR9 prezentuje charakterystyczną dla receptorów Toll-podobnych trójdomenową budowę. *N*-końcowa domena ECD (ang. *Extracellular Domain*) skierowana jest do światła endosomu i warunkuje wiązanie liganda, krótka domena przezbłonowa TMD (ang. *Transmembrane Domain*) ma postać pojedynczej α -helisy, natomiast *C*-końcowa

cytoplazmatyczna część receptora, ICD (ang. *Intracellular Domain*), jest typową domeną TIR (8) (Rys. 3.).



Rys. 3. Budowa receptora Toll-podobnego 9

Domena *N*-końcowa zbudowana jest z 25 motywów LRR ułożonych tandemowo na kształt podkowy, otoczonych strukturami osłaniającymi bogatymi w cysteinę. Każde LRR ma strukturę β -nić-zwrot- α -helisa, w której β -nici złożone z 10 reszt aminokwasowych formują wewnętrzną stronę podkowy, natomiast α -helisy tworzą wystające pętle i budują wypukłą stronę domeny (79). W domenie ICD TLR9 zidentyfikowano specyficzne insercje występujące w obrębie LRR 2, 5 i 8, których usunięcie zaburzało prawidłowe wiązanie agonisty (80).

Receptor TLR9 jest kotwiczony do endosomu przez domenę TMD, jednokrotnie przebijającą błonę pęcherzyka (8). Znaczenie TMD w procesie dokowania TLR9 do endosomu nie zostało w pełni wyjaśnione. Niezależne grupy badawcze pokazywały zarówno, że domena ta nie wpływa na prawidłowe umiejscowienie receptora w komórce lub że zaburzenie sekwencji aminokwasowej TMD może warunkować kotwiczenie TLR9 w błonie komórkowej, zakłócać powstawanie dojrzałej formy receptora i prowadzić do jego aktywacji endogennym DNA (81-83).

C-końcową część cytoplazmatycznej domeny ICD stanowi region TIR niezbędny do dimeryzacji receptora i przekazania sygnału (8). Wykazano, że TLR9 od początku funkcjonuje jako dimer, a wiązanie liganda zapoczątkowuje szereg zmian konformacyjnych, co skutkuje zbliżeniem domen TIR monomerów umożliwiającym dokowanie MyD88 (84). Rozwiązanie struktury mysiego TLR9 za pomocą krystalografii rentgenowskiej wprowadziło pewne wątpliwości dotyczące dimeryzacji receptora poprzedzającej wiązania liganda. Pokazano, że w kryształach jedynie receptor związany z ligandem formował homodimer. Natomiast wolny TLR9 lub związany z inhibitorowym ODN przyjmował postać monomeru (85).

3.3.3 Transport i dojrzewanie TLR9

Prawidłowe, endosomalne umiejscowienie TLR9 warunkuje specyficzną aktywację DNA pochodzącym od patogenów, a także uniemożliwia wiązanie endogennych kwasów nukleinowych. Chimeryczny TLR9, którego domeny TMD i ICD pochodziły od TLR4 lokował się w błonie komórkowej i wiązał endogenne DNA oraz syntetyczne oligonukleotydy z sekwencjami CpG. Tracił jednak zdolność do rozpoznawania zakażeń wirusowych, co, zgodnie z doniesieniami literaturowymi, wynikało z konieczności degradacji kapsydów wirusowych w endosomach i uwolnienia materiału genetycznego do wnętrza pęcherzyka. Dlatego też właściwy transport i dokowanie TLR9 w błonie endosomu wydają się krytyczne w procesie rozpoznawania liganda (83) (Rys. 4).

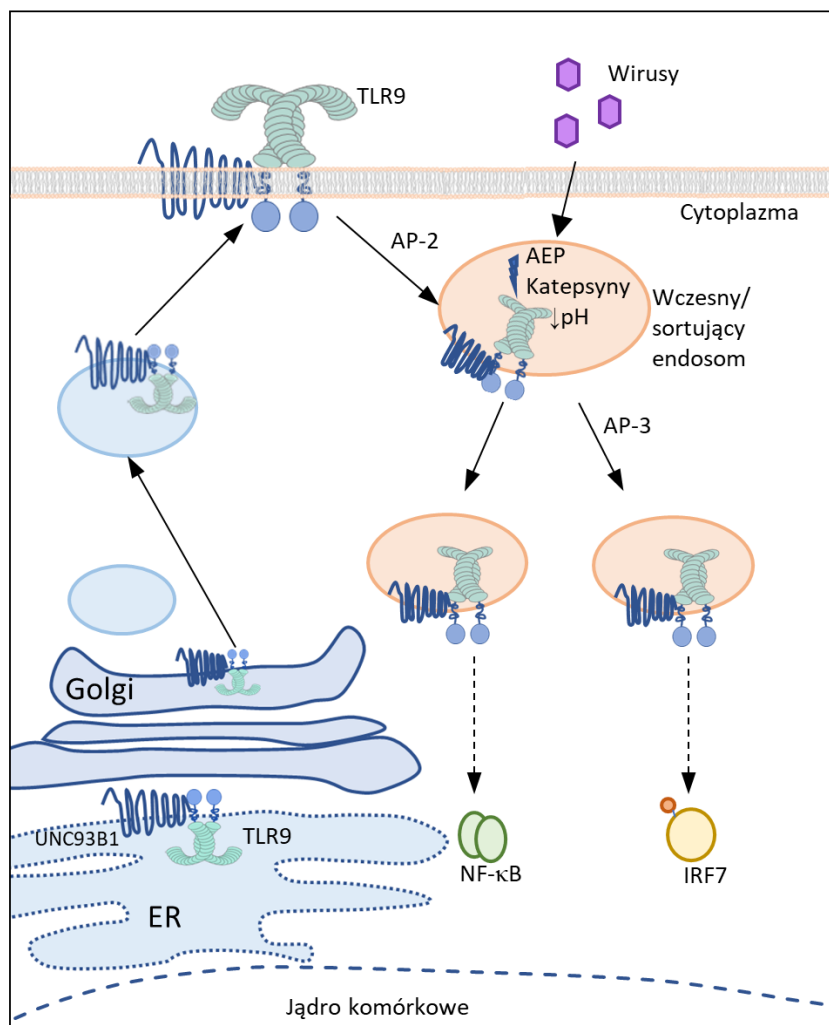
Badania zarówno procesu translokacji TLR9 z ER do endosomu, jak i dojrzewania receptora dostarczają wielu sprzecznych danych. Wykazano, że mechanizm transportu i dojrzewania receptora może różnić się pomiędzy typami komórek. Procesy zachodzące w pDC nie zawsze znajdowały swoje odzwierciedlenie w limfocytach B i makrofagach. Ponadto niektóre dane mogły być mylnie interpretowane ze względu na wykorzystanie do analiz komórek wykazujących nadekspresję genu dla TLR9.

Istnieją zatem dwie hipotezy dotyczące losów TLR9 w komórce. Według pierwszej z nich w komórkach dendrytycznych receptor utrzymywany jest w stanie nieaktywnym w retikulum endoplazmatycznym aż do czasu stymulacji komórek ligandem CpG ODN (86, 87). Z kolei zgodnie z doniesieniami dotyczącymi limfocytów B i makrofagów stymulacja nie ma znaczącego wpływu na translokację receptora. W około 70% populacji niestymulowanych makrofagów odnajdowano TLR9 w endolizosomach, natomiast analiza dystrybucji TLR9 pomiędzy konkretnymi przedziałami komórkowymi wykazała, że w komórkach spoczynkowych 10% puli TLR9 utrzymywane jest w endosomach, a 90% w ER. Aktywacja komórek wpływała nieznacznie na rozmieszczenie receptora, bowiem po stymulacji ligandem jedynie 15% puli TLR9 trafiało do endosomów (88).

Za translokację TLR9 pomiędzy przedziałami komórkowymi odpowiada m.in. białko UNCB93B1, które jest homologiczne do Unc-93 pochodzącego z *Caenorhabditis elegans* (89). To 12-krotnie przebijające błonę białko warunkuje transport endosomalny wszystkich TLR rozpoznających kwasy nukleinowe (TLR3, TLR7, TLR9, TLR 11 i TLR13) (90, 91). Wykazano, że mutacje w obrębie genu kodującego UNC93B1 powodują zaburzenie przekazania sygnału od TLR9, przyczyniają się do zwiększonej podatności na infekcje, a w skrajnych przypadkach mogą prowadzić do rozwoju chorób z autoagresji (90, 92).

UNC93B1 oddziałuje fizycznie z domeną transmembranową TLR9 i asystuje receptorowi podczas całej jego drogi z ER do endosomu (89, 93). Zauważono, że białko to spośród wszystkich endosomalnych TLR, preferencyjnie wiąże TLR9, natomiast wprowadzenie

mutacji, która przesuwa przewagę w stronę TLR7 przyczynia się do rozwoju niekontrolowanego stanu zapalnego, co sugeruje, że zmiana sekwencji aminokwasowej UNC93B1 może być podłożem chorób z autoagresji, takich jak SLE, reumatoidalne zapalenie stawów lub łuszczyca (94, 95).



Rys. 4. Dojrzewanie i transport receptora TLR9 (104)

Przeniesienie kompleksu TLR9-UNC93B1 do endosomu uzależnione jest od pęcherzyków opłaszczonych COPII (ang. *Coat Protein II*), transportujących białka z ER do aparatu Golgiego, w którym podlegają one glikozylacji (96, 97). Zaskakującym jest fakt, że TLR9 nie trafia bezpośrednio do pęcherzyków endosomalnych, ale najpierw kotwiczony jest do błony komórkowej, skąd dzięki oddziaływaniu UNC93B1 z kompleksem białek adaptorowych AP-2 pobierany jest na drodze endocytozy (93). Po zakotwiczeniu w błonie endosomu TLR9 zostaje uwolniony od UNC93B1, w odróżnieniu do TLR7, który jest funkcjonalny pozostając w kompleksie z tym białkiem, ponadto takie oddziaływanie jest prawdopodobnie wymagane przez kolejne mechanizmy regulacji, zapobiegające rozwojowi chorób z autoagresji (98).

Dokowanie TLR9 do endosomu pozwala na przeprowadzenie modyfikacji proteolitycznych *N*-końcowej domeny tego receptora, które prowadzą do powstania jego funkcjonalnej formy.

W obróbkę proteolityczną TLR9 zaangażowane są AEP (ang. *Asparagine Endopeptidase*, endopeptydaza asparaginowa) oraz rodzina katepsyn (99, 100). Potencjalne miejsce cięcia dla tych enzymów znajduje się w obrębie niekonserwatywnej pętli pomiędzy LRR14 a LRR15.

Pierwszy etap cięcia przeprowadza AEP, która usuwa część ektodomeny TLR9, pozostawiając fragment receptora o masie 72 kDa (99). Cięcie jest następnie kontynuowane przez katepsyny, co prowadzi do powstania formy dojrzałej. Wykazano, że zahamowanie aktywności AEP nie zaburza procesu cięcia TLR9, bowiem całość obróbki jest wówczas zależna od katepsyn, natomiast inhibicja katepsyn skutkuje powstaniem niefunkcjonalnego receptora mimo obecności aktywnej AEP (100-102). Znaczenie modyfikacji TLR9 przeprowadzanej przez proteazy nie zostało dokładnie wyjaśnione, gdyż receptor, który nie został im poddany może wiązać ligand, jednakże nie jest zdolny do przekazania sygnału (101). Co ciekawe, dane sugerują, że odcięty fragment *N*-końcowy nie ulega degradacji, ale pozostaje związany z *C*-końcową częścią receptora tworząc TLR9N+C. Za łączenie obu odcinków odpowiada najprawdopodobniej omawiana już wcześniej pętla LRR14, wystająca ponad powierzchnię domeny ECD. Pokazano, że jedynie kompleks TLR9N+C może prawidłowo przekazać sygnał, podczas gdy *C*-końcowy fragment jedynie wiąże ligand bez aktywowania dalszych białek szlaku (103).

3.4 BIAŁKA ADAPTOROWE RECEPTORÓW TOLL-PODOBNYCH

Związanie liganda przez zewnątrzkomórkową domenę TLR prowadzi do zmian konformacyjnych w obrębie domeny TIR, co skutkuje rekrutacją właściwego białka adaptorowego i zapoczątkowuje aktywację kaskady sygnałowej.

Rodzina białek adaptorowych oddziałujących z receptorami Toll-podobnymi składa się z pięciu członków: MyD88 (ang. *Myeloid Differentiation Primary response protein 88*), TIRAP/Mal (ang. *TIR-domain containing Adapter Protein/ MyD88 Adapter-Like*), TRIF/TICAM1 (ang. *TIR-domain Containing Adapter Molecule/ TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), TRAM/TICAM2 (ang. *TRIF-related adaptor molecule*), SARM (ang. *Sterile-Alpha and Armadillo Motif protein*) (6). Białka te mają zdolność wiązania się z receptorem na zasadzie homotypowego oddziaływania domen TIR. Dwa z tych białek, a mianowicie MyD88 i TRIF tworzą rusztowanie do powstawania większych kompleksów białkowych przekazujących sygnał na dalsze części szlaku, stąd nazwy tych kompleksów „Myddosome” lub „Trifosome”, natomiast białko SARM, jako jedyne, pełni wyłącznie funkcję negatywnego regulatora szlaków TLR (105).

3.4.1 Myddosome

Myd88 zostało poznane jeszcze przed odkryciem receptorów TLR jako gen, którego ekspresja była indukowana podczas różnicowania mieloblastów (106). W 1998 roku funkcja białka, będącego produktem ekspresji *Myd88* została powiązana z indukcją odpowiedzi odpornościowej przez receptory Toll-podobne (107).

Białko MyD88 zbudowane jest z 296 reszt aminokwasowych i posiada dwie funkcjonalne, oddzielone od siebie domeny: C-kończącą domenę TIR umożliwiającą oddziaływanie z innymi białkami posiadającymi TIR oraz N-kończącą domenę śmierci, DD (ang. *Death Domain*), rekrutującą kinazy z rodziny IRAK (ang. *IL-1R-Associated Kinase*) dzięki homotypowym oddziaływaniom domen DD. Domeny te łączy ze sobą krótki odcinek nazwany domeną pośrednią, INT (ang. *Intermediate*), której usunięcie skutkuje zaburzeniem sygnału lub jego całkowitym zahamowaniem (107, 108).

MyD88 wykorzystywane jest przez prawie wszystkie, z wyjątkiem TLR3, receptory Toll-podobne. Obecność tego białka adaptorowego warunkowała indukcję prawidłowej odpowiedzi odpornościowej przez CpG w komórkach pozbawionych TLR2 i TLR4, co skłoniło badaczy do poszukiwań kolejnych receptorów z rodziny Toll-podobnych i doprowadziło do identyfikacji TLR9 (58). Przy braku odpowiedniego liganda dla receptora angażującego MyD88, białko to jest utrzymywane w stanie nieaktywnym, najprawdopodobniej poprzez wewnętrzne oddziaływanie domen DD, natomiast po rekrutacji domeny TIR MyD88 do receptora oddziaływanie to zostaje przerwane (109).

Przekazanie sygnału poprzez białko adaptorowe MyD88 jest zależne od powstania kompleksu zwanego Myddosomem złożonego z białek posiadających domenę DD (110, 111). Badania krystalograficzne ujawniły strukturę tego oligomeru, który przyjmuje postać helikalną zbudowaną z sześciu domen DD białka MyD88, czterech DD kinazy IRAK4 oraz czterech kinazy IRAK2. Dokowanie kolejnych białek do tego kompleksu jest sekwencyjne: do heksameru MyD88 rekrutowana jest IRAK4, a następnie jeden z jej substratów IRAK2 lub IRAK1 (111). Oligomeryzacja MyD88 zapoczątkowująca składanie całego kompleksu wydaje się być kluczowym aspektem prawidłowego organizowania tej struktury.

Zarówno TLR7/8, jak i TLR9 angażują do przekazywania sygnału MyD88. W plazmacytoidalnych komórkach dendrytycznych MyD88 i TRAF6 tworzą kompleks z czynnikiem transkrypcyjnym IRF7, w którym czynnik ten zostaje aktywowany dzięki aktywności ligazy ubikwityny E3 białka TRAF6 (112, 113). Ubikwitynacja IRF7 jest niezbędna do fosforylacji tego czynnika przez kinazę IRAK1 aktywowaną wcześniej przez IRAK4.

Dokowanie białka MyD88 do domeny TIR receptorów Toll-podobnych nie zawsze zachodzi w sposób bezpośredni i wymaga uczestnictwa innego białka adaptorowego, jakim jest białko Mal.

3.4.1.1 Mal/TIRAP

Białko Mal zostało zidentyfikowane w 2001 roku, niemal jednocześnie przez dwa niezależne zespoły badawcze jako drugie po MyD88 białko adaptorowe receptora TLR4 posiadające domenę TIR, stąd też jego nazwy: Mal – *MyD88-apater-like* oraz TIRAP – *TIR-domain-containing adapter protein* (114, 115). Pierwsze doniesienia dotyczące białka Mal opisywały je jako adaptor sortujący, warunkujący specyficzność szlaków sygnałowych zależnych od TLR, gdyż pokazano, że w odróżnieniu od MyD88 angażowany jest on jedynie przez niektórych członków rodziny TLR, m.in. TLR4, TLR2, TLR1 i TLR6. Z uwagi na brak różnic w odpowiedzi na ligandy receptorów endosomalnych, takich jak TLR9 postulowano, że Mal oddziałuje jedynie z TLR kotwiczonymi w błonie komórkowej (114, 116, 117).

Mal jest małym białkiem o masie około 26 kDa, a jego forma obecna w organizmie ludzkim zbudowana jest z 235 reszt aminokwasowych. Gen *TIRAP* ulega ekspresji w wielu typach komórek m.in. w makrofagach, komórkach dendrytycznych i fibroblastach. W budowie białka Mal można wyróżnić 2 podstawowe domeny: *N*-końcową domenę wiążącą reszty lipidowe obecne w błonie komórkowej oraz wspominaną już *C*-końcową domenę TIR warunkującą wiązanie tego białka do receptorów Toll-podobnych i MyD88.

Postulowano, że Mal swoją domeną *N*-końcową oddziałuje preferencyjnie z fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanem (PI(4,5)P₂), co było wzmocnieniem poglądu o udziale tego białka w przekazywaniu sygnału wyłącznie od błonowych TLR, gdyż błona komórkowa w odróżnieniu od błony endosomu bogata jest właśnie w PI(4,5)P₂. Co więcej Mal lokalizowano w tych samych mikrodomenach błonowych, w których zakotwiczony był TLR4 (118). Na podstawie powyższych danych wnioskowano, że Mal nie jest wykorzystywany przez TLR rozpoznające kwasy nukleinowe. Pierwsze doniesienie o jego udziale w szlaku sygnałowym endosomalnych TLR dotyczyło TLR3, jednak, co zaskakujące, pokazano, że Mal reguluje negatywnie inicjowaną przez TLR3 ekspresję *IFNB1*. Okazało się bowiem, że pod wpływem stymulacji ligandem dla TLR3, jakim jest poly I:C komórki pozbawione genu *TIRAP* produkują wielokrotnie większe ilości interferonu beta w porównaniu z komórkami typu dzikiego. Analiza tego fenomenu wykazała, że Mal ma zdolność do bezpośredniego oddziaływania z czynnikiem transkrypcyjnym IRF7 i blokowania, prawdopodobnie poprzez uniemożliwienie fosforylacji IRF7, jego wiązania do domeny PRDI-III wzmacniacza obecnego w regionie regulatorowym *IFNB1* (119).

Pomiędzy domeną *N*-końcową, a domeną TIR, w pozycji 86 łańcucha aminokwasowego, występuje reszta tyrozyny fosforylowana przez kinazę Brutona. Druga taka reszta mieści się w obrębie domeny TIR, w pozycji 187. Wykazano, że fosforylacja Mal zachodzi pod wpływem stymulacji TLR2 i TLR4 i jest wymagana do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB (120).

Domena TIR białka Mal przyjmuje charakterystyczną dla wszystkich TIR strukturę trzeciorzędową. Zbudowana jest ona z ułożonej centralnie pięcioniciowej β -kartki (β A- β E) otoczonej pięcioma α -helisami (α A- α E). Natywna forma białka posiada typową pętlę BB łączącą α B z β B (121). Dane te pozostają w zgodzie z założeniami Fitzgerald i wsp. poczynionymi na podstawie porównania sekwencji aminokwasowych znanych domen TIR. Zaobserwowano wtedy, że motywy charakterystyczne dla pętli BB w TLR2 są zachowane w domenie TIR białka Mal (115). Odmienne dane uzyskano metodą krystalografii rentgenowskiej. Zgodnie z nimi w obrębie domeny TIR Mal miała powstawać nietypowa, wydłużona pętla AB (pomiędzy α A i β B) stabilizowana dodatkowo wiązaniami disiarczowymi (122). Okazało się jednak, że uwidoczniona struktura jest w rzeczywistości zaburzeniem prawidłowego fałdowania białka, wynikającym z warunków eksperymentu.

Domena TIR jest regionem umożliwiającym zarówno homo- jak i heterotypową interakcję białka Mal. Homotypowe oddziaływanie TIR:TIR zapewnia bezpośrednie dokowanie się Mal do receptora TLR, czy też wiązanie MyD88. Oddziaływania heterotypowe np. z białkiem TRAF6 pozwalają na przekazanie sygnału do kolejnych białek szlaku. W strukturze domeny TIR uwidoczniono 4 regiony (I-IV), które, oprócz pętli BB, są szczególnie istotne w interakcjach Mal z innymi białkami. Pierwszy z nich (region I) odpowiada za tworzenie się symetrycznego homodimeru Mal poprzez oddziaływanie zewnętrznych powierzchni TIR (ang. *back-to-back*). Dalsza analiza dimeru pozwoliła na odkrycie kolejnych regionów (II, III i IV) będących potencjalnymi miejscami wiązania dla białka MyD88 oraz TLR4. Wprowadzenie mutacji w jednym z tych regionów zaburzało oddziaływania białek, a także aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (123). Z danych literaturowych wynika, że białko Mal ma również zdolność do formowania filamentów *in vitro*, w których dwie równoległe nici wiążą się ze sobą „głowa do ogona” dzięki oddziaływaniu pętli BB w obrębie domeny TIR. Ponadto filamenty te mogą wiązać TLR4 i indukować powstawanie oligomerów MyD88 (124).

W obrębie domeny TIR białka Mal, pomiędzy resztami aminokwasowymi 188 i 193, występuje miejsce potencjalnego wiązania ligazy ubikwityny TRAF6, które nie jest obecne w MyD88. Prawdopodobnie właśnie to miejsce odpowiada za dokowanie TRAF6 do struktury Myddosomu, bowiem pokazano metodą koimmunoprecypitacji bezpośrednie oddziaływanie białek Mal i TRAF6. Ponadto zamiana kwasu glutaminowego na alaninę w pozycji 190 sekwencji aminokwasowej Mal powodowała zaburzenie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B zależnej od receptorów TLR2 i TLR4, które angażują TRAF6 w swoim szlaku sygnałowym (125).

Zgodnie z piśmiennictwem reszta asparagianu w pozycji 198 łańcucha polipeptydowego Mal jest potencjalnym miejscem cięcia dla kaspazy-1, która jest m.in. odpowiedzialna za obróbkę prekursora IL-1 β warunkującą powstawanie formy aktywnej. Dzięki zastosowaniu drożdżowego systemu dwuhybrydowego pokazano zdolność do bezpośredniego oddziaływania Mal i kaspazy-1. Jednakże rola proteolitycznego cięcia Mal przez kaspazę-1

pozostaje kontrowersyjna. Miggin i wsp. postulowali, że Mal jest substratem dla kaspazy-1, a cięcie jest wymagane do aktywacji NF- κ B na drodze zależnej od TLR2 i TLR4 (126). Z kolei odrębny zespół badaczy wykazał, że cięcie Mal przez kaspazę-1 nie tylko nie jest niezbędne do prawidłowej aktywacji odpowiedzi odpornościowej, ale może skutkować utratą funkcji adaptorowej białka, gdyż krytyczna reszta Y198 tworzy miejsce o negatywnym ładunku wymagane również do oddziaływania z domenami TIR TLR4 i MyD88 (127).

Wczesne badania dotyczące roli białka adaptorowego Mal w szlakach sygnałowych receptorów Toll-podobnych jednoznacznie wskazywały na jego rekrutację jedynie do domen TIR receptorów błonowych, negując tym samym zaangażowanie adaptoru przez receptory endosomalne (116). Postulowano, że Mal stanowi pomost pomiędzy dodatnio naładowanymi domenami TIR TLR4 i MyD88, ułatwiając interakcję obu białek.

Oddziaływanie TIR-TIR Mal i MyD88 możliwe jest dzięki różnicom w ładunkach elektrostatycznych obu domen. Podczas gdy domena TIR MyD88 jest w przeważającej części zbudowana z aminokwasów zasadowych, TIR Mal posiada na swojej powierzchni reszty aminokwasowe naładowane ujemnie, tworzące miejsca interakcji z MyD88. Jedną z niezbędnych do wiązania MyD88 jest reszta kwasu asparaginowego w pozycji 96 łańcucha polipeptydowego Mal, umiejscowiona poza omawianymi wcześniej potencjalnymi miejscami interakcji. Zamiana tego aminokwasu na asparaginę (D96N) powoduje najprawdopodobniej zniesienie ładunku niezbędnego do oddziaływania Mal i MyD88, gdyż wariant D96N zachowywał zdolność do wiązania TLR2 i TLR4 przy jednoczesnym upośledzeniu sygnału aktywowanego przez TLR2 oraz MyD88-zależną gałąź kaskady TLR4 (122, 128).

Białko Mal jest najbardziej polimorficznym ze wszystkich białek adaptorowych z domeną TIR. Zidentyfikowano co najmniej 8 niesynonimicznych SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) w regionie kodującym Mal, spośród których, najlepiej scharakteryzowanym jest SNP warunkujący powstanie wariantu S180L (rs 8177374), w którym seryna w pozycji 180 łańcucha polipeptydowego podstawiona jest leucyną (129). Wyniki badań dotyczących tego polimorfizmu są kontrowersyjne. Początkowo wariantowi S180L przypisywano działanie ochronne u pacjentów ze zdiagnozowaną gruźlicą, chorobą pneumokokową, bakteremią bądź malarią pochodzących z odrębnych grup etnicznych (Wielka Brytania, Wietnam, Kenia). Zauważono, że polimorfizm S180L ma związek z zahamowaniem przekazywania sygnału od TLR2 (129). Badania przeprowadzone przez Khora i wsp. nie znalazły jednak potwierdzenia w wynikach otrzymanych przez inny zespół (130), a metaanaliza obejmująca dane pochodzące z dziewięciu niezależnych doniesień wykazała brak związku wariantu S180L z obniżeniem ryzyka zapadalności na gruźlicę (131).

Zauważono ponadto, że inny SNP, występujący u ludzi z bardzo niską częstością i warunkujący powstanie opisanego już wcześniej wariantu D96N jest potencjalnie zagrażający życiu ze względu na zahamowanie produkcji TNF α w odpowiedzi na aktywację TLR2/4.

Co za tym idzie, homozygoty pod względem tego polimorfizmu byłyby wysoce podatne na zakażenia bakteriami Gram + i Gram - (128).

W strukturze pierwszorzędowej Mal istnieje kilka newralgicznych reszt aminokwasowych, których zastąpienie powoduje upośledzenie funkcji białka. Pierwsza z tych substytucji została pokazana już na etapie identyfikacji białka Mal. Dowiedziono, że zastąpienie proliny w pozycji 125 histydyną nie tylko uniemożliwia przekazanie sygnału przez Mal, ale także hamuje aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B indukowaną przez konstytutywnie aktywny receptor TLR4 (114). Ponadto pokazano, że Mal wrażliwe jest na zmienne warunki oksydoredukcyjne wewnątrz komórki. W warunkach stresu oksydacyjnego cysteina w pozycji 91 łańcucha polipeptydowego podlega glutationylacji, a jej zamiana na alaninę skutkowałą upośledzeniem sygnału od TLR4, manifestującym się brakiem aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Dodatkowo substytucja sąsiadującej histydyny na prolinę (H92P) również zaburzała proces glutationylacji. Oba warianty białka Mal, zarówno C91A jak i H92P nie oddziaływały z MyD88 oraz IRAK4 (121).

3.4.2 Trifosome

Początkowo sądzono, że za indukcję interferonów typu pierwszego po aktywacji TLR4 odpowiada Mal, jednakże po odkryciu jego roli jako białka kotwiczącego MyD88 udało się zidentyfikować inny adaptor zaangażowany przez TLR4, a mianowicie TRIF (40). Zauważono, że TRIF w odpowiedzi na LPS, pośredniczy w uruchamianiu kaskady sygnałowej indukującej syntezę IFN β (132). Ponadto za pomocą koimmunoprecypitacji udowodniono, iż TRIF wiąże się do cytoplazmatycznej części TLR3 i jest jedynym białkiem adaptorowym wykorzystywanym przez ten receptor (133).

TRIF, w porównaniu z innymi adaptorami TLR, jest dość dużym białkiem, zbudowanym z 712 reszt aminokwasowych. Domena N-końcowa (TRIF-NTD) ma postać α -helisy, natomiast odcinek C-końcowy stanowią domena TIR oraz domena RHIM (ang. *Receptor Interacting Protein (RIP) Homotypic Interaction Motif*) oddziałująca z kinazą RIP1. Pomiędzy końcami C i N znajduje się region bogaty w prolinę, w obrębie którego występują miejsca oddziaływania z białkami efektorowymi TRAF2 i TRAF6 (ang. *TNF Receptor-Associated Factor*) oraz TBK1 (ang. *TANK Binding Kinase 1*) (134, 135). W komórkach niestymulowanych TRIF ulega autoinhibicji poprzez wiązanie się domen TRIF-NTD i TIR, co uniemożliwia dokowanie białek efektorowych. Podczas infekcji wirusowej TBK1 wraz z niekanoniczną kinazą IKK ϵ fosforylują czynnik transkrypcyjny IRF3 (ang. *Interferon Regulatory Factor 3*), co prowadzi do jego homodimeryzacji bądź heterodimeryzacji z IRF7, translokacji do jądra komórkowego i wiązania się do sekwencji wzmacniacza w regionie regulatorowym genu *IFNB1* (136). Jak wspomniano wcześniej, do prawidłowej rekrutacji białka TRIF do domeny TIR receptora TLR4 wymagany

jest adaptor pomostowy, jak ma to miejsce w przypadku szlaku sygnałowego aktywowanego przez ten receptor z błony komórkowej. Do TLR4 ulokowanego w błonie endosomu wiąże się TRAM i jest to adaptor wykorzystywany jedynie przez TLR4 (80, 137).

3.5 AKTYWACJA SZLAKU SYGNAŁOWEGO TLR9

Wiązanie liganda przez TLR9 uzależnione jest od złożonego mechanizmu dojrzewania receptora, ale także warunków panujących we wnętrzu endosomu. Wiadomym jest, że patogeny wnikać do wnętrza komórki na drodze endocytozy ulegają degradacji we wnętrzu pęcherzyka, co determinuje dostępność liganda TLR9, jakim jest DNA. Pokazano, że genom drobnoustrojów lub wirusów nie tylko zostaje uwolniony z ich wnętrza, ale podlega także cięciu przez obecne w endosomach nukleazy, m.in. DNazę II. Komórki z delecją genu kodującego ten enzym wykazywały upośledzenie aktywacji odpowiedzi odpornościowej po stymulacji CpG-A ODN. Taki efekt nie był widoczny, gdy komórki traktowano odpornym na działanie nukleaz CpG-B ODN (138).

Różnice w strukturze syntetycznych oligonukleotydów warunkują ich właściwości – nie tylko wspomnianą wyżej odporność na degradację enzymatyczną, ale także indukcję ekspresji odmiennego repertuaru cytokin bądź aktywację proliferacji komórek. Rozbieżności w efektach uzyskiwanych po stymulacji CpG typu A i B najprawdopodobniej nie wynikają wprost z motywu CpG, ani typu szkieletu jaki posiadają oligonukleotydy, ale z możliwości tworzenia przez nie złożonych struktur, które to z kolei wpływają na czas i mechanizm migracji między pęcherzykami systemu endocytarnego.

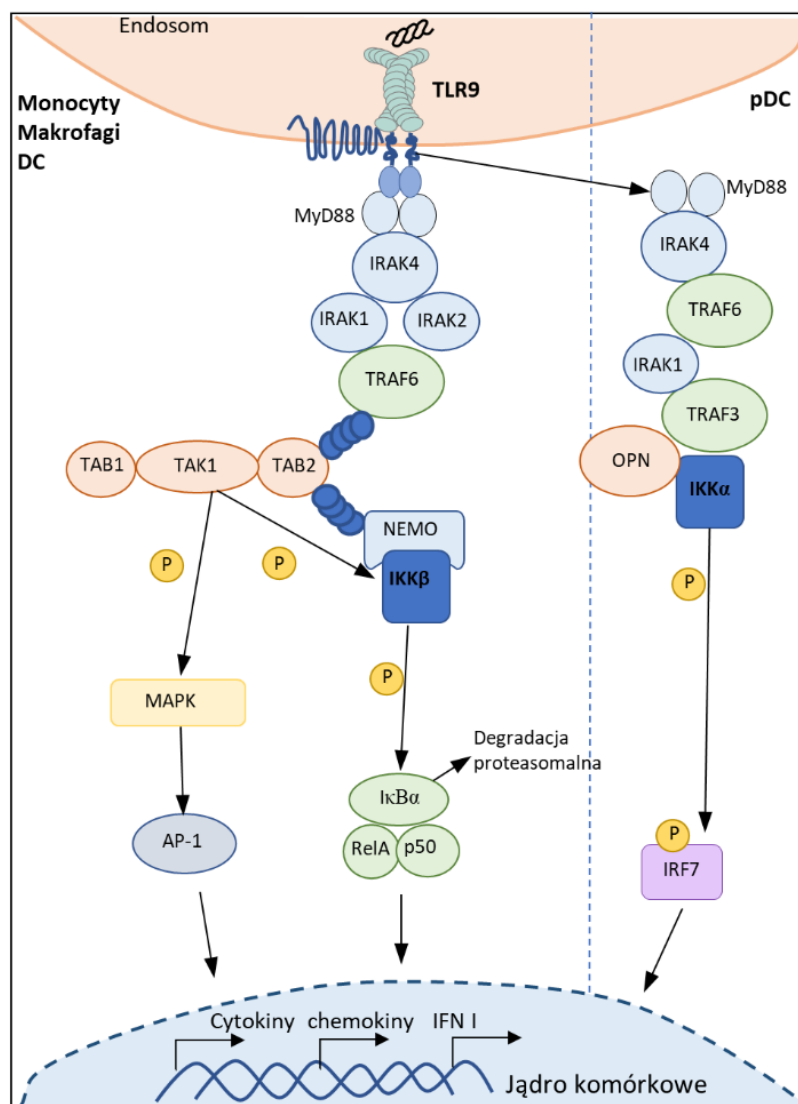
Większość badań skupiających się na poznaniu szlaku sygnałowego zależnego od TLR9 zostało przeprowadzonych na komórkach pDC. Komórki te przede wszystkim są uważane za głównych producentów IFN typu I, poza tym posiadają unikalne struktury zwane organellami związanymi z lizosomami (ang. *Lysosome-related organells*, *LRO*) pozwalające na obserwację rozdzielania szlaku sygnałowego uruchamianego przez TLR9.

Zgodnie z powszechnie przyjętymi danymi CpG typu A, dzięki zdolności do formowania złożonych agregatów pozostaje na dłużej we wczesnym endosomie wzmagając produkcję interferonów typu I przez komórki dendrytyczne, a w następstwie aktywację komórek NK. Natomiast liniowy CpG-B jest szybko transportowany do późnego endosomu skąd uruchamia szlak sygnałowy warunkujący proliferację limfocytów B i wydzielanie przez nie przeciwciał, a także sekrecję IL-6 i TNF α przez komórki pDC (139-142).

Nowsze doniesienia wskazują, że rozwidlenie sygnału warunkowane jest najprawdopodobniej obecnością kompleksu białek adaptorowych AP-3, który odpowiada za transport receptora TLR9 związanego z CpG-A z wczesnych endosomów do pęcherzyków LRO. Kompleksy AP-3 i wspomniany wcześniej AP-2, zwane także adaptynami, kontrolują proces

sortowania białek opuszczających aparat Golgiego. AP-3 kieruje ładunek do endosomu i dalej do pęcherzyków lizosomalnych. Delecja genu dla podjednostki $\beta 3A$ kompleksu AP-3 (*Ap3b1^{-/-}*) w komórkach pDC manifestowała się upośledzoną sekrecją IFN α w odpowiedzi na stymulację CpG. Jak pokazano, efekt ten uzależniony był od zahamowania transportu TLR9 związanego z CpG-A z endosomu do pęcherzyków LRO, co uniemożliwiało aktywację czynnika transkrypcyjnego IRF7 (143). W odróżnieniu od poprzednio proponowanego modelu, wczesny endosom pełni rolę sortującą, w którym następuje rozdzielanie sygnału. Jako pierwszy aktywowany jest NF- κ B, a dopiero przetransportowanie receptora związanego z ligandem do LRO, uzależnione od AP-3, warunkuje fosforylację IRF7. Ponadto AP-3 bezpośrednio oddziałuje z IRF7 ułatwiając interakcję tego czynnika transkrypcyjnego z dokowanym przez TLR9 białkiem TRAF3 (142, 143).

Szlak sygnałowy zależny od TLR9 różni się w różnych typach komórek (Rys. 5.).



Rys. 5. Szlak sygnałowy receptora Toll-podobnego 9 w różnych typach komórek (144, 145)

W cDC (ang. *conventional Dendritic Cells*) i makrofagach głównym aktywowanym czynnikiem transkrypcyjnym jest NF- κ B, natomiast w pDC opisane wcześniej rozwidlenie sygnału skutkuje rekrutacją innego repertuaru białek m.in. osteopontyny (OPN) oraz TRAF3 i umożliwia aktywację czynnika IRF7. W monocytach, makrofagach i cDC po związaniu liganda przez TLR9 do domeny TIR receptora rekrutowany jest kompleks Myddosome'u. Jak wspomniano wcześniej, Myddosome składa się z białek MyD88, kinazy IRAK4 i jej substratów IRAK1/IRAK2 (111). Istnieją dwa hipotetyczne modele składania Myddosome'u, pierwszy z nich zakłada sekwencyjną organizację struktury, natomiast drugi sugeruje, że białka MyD88 spontanicznie tworzą nieaktywny kompleks, który dopiero po związaniu do domeny TIR receptora Toll-podobnego jest zdolny do interakcji z IRAK4 (146). Po aktywacji Myddosome'u IRAK4 fosforyluje IRAK1/IRAK2, co warunkuje rekrutację i aktywację E3 ligazy ubikwityny – TRAF6. TRAF6 współtworzy rodzinę siedmiu białek TRAF, zaangażowanych przez szereg receptorów do aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- κ B i AP-1 (147). Aktywowany TRAF6, wspólnie z białkami kompleksu E2, UBC13 i UEV1A, odpowiada za poliubikwitynację białka NEMO/IKK γ (ang. *NF- κ B Essential Modulator/ I κ B Kinase γ*) oraz podlega autoubikwitynacji. NEMO stanowi podjednostkę regulatorową kompleksu IKK (IKK α i IKK β), która utrzymuje podjednostki katalityczne w stanie nieaktywnym. Poliubikwitynacja NEMO na reszcie lizyny 63 skutkuje kotwiczeniem IKK z białkiem adaptorowym kinazy TAK1 (ang. *Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1*) – TAB2 (ang. *TAK1 Binding protein 2*) (148-150). Oddziaływanie to pozwala na bezpośrednią interakcję kinaz i fosforylację IKK β przez TAK1. Aktywna IKK β katalizuje fosforylację podjednostki inhibitorowej czynnika transkrypcyjnego NF- κ B – I κ B, co prowadzi do jej proteasomalnej degradacji i umożliwia translokację NF- κ B do jądra komórkowego. IKK mają też możliwość fosforylowania prekursora podjednostki p50 NF- κ B, a mianowicie p105 (149). Białko to może funkcjonować jako inhibitor kinazy z rodziny MAP (ang. *Mitogen Activated Protein Kinase*) – Tpl2/MAP3K8 (ang. *Tumor progression locus 2*). Degradacja p105 skutkuje uwolnieniem i aktywacją Tpl2, która w następstwie może fosforylować kolejne białka kaskady kinaz MAP, MEK1 i MEK2 (151). Substratami tych kinaz są białka ERK1/2 (ang. *Extracellular signal Regulated Kinases*) i JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase*), których fosforylacja prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego AP-1 (ang. *Activator Protein-1*). TAK1 może ponadto fosforylować inne kinazy z rodziny MAP, a mianowicie MAPKK3 i MAPKK6, których celem są JNK i p38 aktywujące czynnik transkrypcyjny CREB (ang. *cAMP Response Element-Binding Protein*).

Podsumowując, złożony i bardzo skomplikowany mechanizm transdukcji sygnału zależnego od TLR9 skutkuje aktywacją czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF, NF- κ B, AP-1 i CREB, które współdziałając uruchamiają transkrypcję genów kodujących interferony i szeroki wachlarz cytokin prozapalnych.

Mimo trwających od 20 lat badań dotyczących szlaku sygnałowego zależnego od TLR9 *Mitogen Activated Protein Kinase* nadal nie jest on w pełni poznany, a wiele kwestii stanowi punkty sporne wśród badaczy. Najwięcej wyjaśnień dostarczyły badania, w których do aktywacji receptora stosowano ligandy syntetyczne, ale jak już wspomniano, stosowanie modyfikacji wiązań nukleotydowych, które nie występują naturalnie może zaburzać proces transdukcji sygnału i być przyczyną błędnych interpretacji obserwacji eksperymentalnych.

3.6 NIESWOISTA ODPOWIEDŹ PRZECIWWIRUSOWA – INTERFERONY TYPU I

Interferon został odkryty ponad 60 lat temu przez Isaacs i Lindenmana jako glikoproteina ingerująca (ang. *interfere*) w replikację wirusa grypy (152). Pierwsze badania nad tą cytokiną prowadzone były na błonach kosmówkowo – omoczniovych zarodków kurzych. Wprowadzenie do nich wirusa grypy powodowało w krótkim czasie produkcję interferonu. Szybko okazało się, że jest on produkowany przez wiele typów komórek zwierzęcych.

Niemal 30 lat później udało się oczyścić i scharakteryzować IFN β , który wraz podtypami α , ϵ , κ , ω , δ , μ , τ i ζ współtworzy rodzinę interferonów typu I. Poza IFN typu I komórki ludzkie wydzielają IFN typu II (IFN γ) oraz IFN III (IFN λ 1- λ 4) (152, 153).

Interferony typu I kodowane są przez 30 genów pozbawionych intronów, znajdujących się na chromosomie 9. Efektem ekspresji tych genów są glikoproteiny zbudowane ze 160 – 200 reszt aminokwasowych wykazujące szerokie spektrum działania przeciwwirusowego. IFN typu I produkowane są m.in. na skutek aktywacji receptorów rozpoznających wzorce, zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowych (154).

Synteza interferonu w odpowiedzi na zetknięcie z patogenem jest krytyczna zarówno w przypadku pierwotnej, jak i wtórnej odpowiedzi odpornościowej. Przeciwwirusowa aktywność tej cytokiny związana jest głównie z aktywacją przeszło 1000 genów IRG (ang. *IFN-Regulated Genes*), które hamują rozmaite etapy replikacji wirusów począwszy od wnikania do komórki, poprzez transkrypcję i inicjację translacji, aż do składania i uwalniania wirionów potomnych. Do genów regulowanych przez IFN typu I należy m.in. syntetaza 2',5' oligoadenylova, której produkty aktywują RNazę L odpowiedzialną za degradację wirusowego RNA. Innym ważnym białkiem indukowanym przez interferony jest kinaza białkowa R (ang. *Protein Kinase R, PKR*). PKR aktywowana przez dsRNA fosforyluje czynnik inicjacji translacji eIF2 α , blokując tym samym syntezę białek wirusowych (154).

Mimo istotnej roli jaką interferon pełni w odpowiedzi przeciwwirusowej, niezmiernie ważna jest ścisła regulacja jego syntezy. Nadprodukcja może prowadzić do wielu niepożądanych efektów m.in. uszkodzenia komórek własnego układu odpornościowego (np. degeneracji błony komórkowej i w rezultacie śmierci makrofagów), szoku septycznego, a nawet rozwoju chorób autoimmunologicznych (155).

3.6.1 Mechanizm aktywacji ekspresji *IFNBI* w odpowiedzi na infekcje wirusowe

Interferon β produkowany jest w odpowiedzi na infekcje wirusowe i w mniejszym stopniu na zakażenia bakteryjne. Rozpoznawanie wirusów może odbywać się na kilka sposobów, angażując receptory zewnątrzkomórkowe bądź wewnątrzkomórkowe oraz wykorzystując do ich aktywacji różne elementy cząsteczek wirusowych. Za identyfikację infekcji wirusowych odpowiedzialne są trzy typy PRR: receptory Toll-podobne (TLR3, TLR7/8, TLR9, TLR4), RIG-podobne (RIG-I, MDA5) oraz sensory cytozolowego DNA (156). Uruchomienie szlaków sygnałowych zależnych tych receptorów prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych, które wspólnie kontrolują ekspresję genu dla interferonu β .

Region wzmacniacza genu *IFNBI* jest jednym z lepiej poznanych i opisanych tego typu elementów regulacji transkrypcji wśród organizmów wyższych. Badania dotyczące regulacji ekspresji genu kodującego IFN β sięgają lat 80 ubiegłego stulecia, kiedy to odkryto, że sekwencja leżąca około 40 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji jest niezbędna do prawidłowej indukcji IFN β w odpowiedzi na infekcję wirusową (157).

Szereg badań dotyczących wzmacniacza genu IFN β dowiódł, że region ten składa się z 4 domem wiążących czynniki transkrypcyjne warunkujące rekrutację molekularnej maszynierii transkrypcyjnej. Domeny te, zwane pozytywnymi domenami regulacyjnymi (ang. *Positive Regulatory Domain, PRD*), umiejscowione są pomiędzy 102 a 47 pz powyżej kodonu start i ułożone są ściśle jedna obok drugiej w określonym porządku: PRD IV, PRD I-III, PRD II. Domena PRD II jest miejscem rekrutacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, do PRD I-III rekrutowane są czynniki IRF3 i IRF7, natomiast PRD IV wiąże czynnik AP-1 (158, 159). Składanie całego kompleksu czynników transkrypcyjnych jest warunkowane przez białko HMGA1a, które najprawdopodobniej modyfikuje strukturę chromatyny i umożliwia oddziaływanie białek ze sobą (159).

Z wczesnych doniesień dotyczących regulacji ekspresji *IFNIB* wynika, że do pełnej aktywacji promotora poza wymienionymi czynnikami transkrypcyjnymi wymagane jest dołączenie koaktywatora CBP/p300, który wiązany jest do podjednostki p65 NF- κ B (160). Związanie się wszystkich czynników transkrypcyjnych wywiera synergistyczny efekt indukcji ekspresji *IFNBI*.

3.7 ROLA RECEPTORÓW TOLL-PODOBNYCH W ROZPOZNAWANIU WIRUSA OPRYSZCZKI POSPOLITEJ TYPU 1

Wirus opryszczki pospolitej typu 1 (łac. *Herpes Simplex Virus, HSV-1/ Human Herpesvirus, HHV-1*) jest niezwykle rozpowszechnionym patogenem ludzkim. Szacuje się, że HSV-1 zakażonych jest około 40-60% osób w wieku 20-40 lat zamieszkujących kraje wysoko rozwinięte, do nawet 70-80% populacji krajów słabo rozwiniętych. Infekcja tym wirusem przyczynia się do występowania zmian zapalnych skóry i błon śluzowych m.in. pęcherzykowych uszkodzeń w obrębie twarzy (najczęściej w okolicach warg i nosa), ale także może prowadzić do poważnych schorzeń, takich jak opryszczkowe zapalenie mózgu (łac. *Herpes Simplex Encephalitis, HSE*). Uważa się, że HSE jest najczęściej występującą postacią zapalenia mózgu, a ponadto charakteryzuje się bardzo wysoką śmiertelnością wśród osób nieleczonych (161).

Wirus opryszczki pospolitej typu 1 zalicza się do podrodziny *Alphaherpesvirinae*, która wraz z *Betaherpesvirinae* i *Gammapherpesvirinae* współtworzy rodzinę *Herpesviridae*. HSV-1 jest dużym wirusem osłonkowym, którego genom o wielkości około 152 kbp stanowi liniowe, dwuniciowe DNA. Materiał genetyczny wirusa zamknięty jest w trójwarstwowym wirionie. Pierwszą warstwę stanowi kapsyd o symetrii ikosaedralnej, który otoczony jest amorficzną warstwą białek zwaną tegumentem. Ostatnią, zewnętrzną warstwę stanowi lipidowa osłonka zawierająca glikoproteiny (162).

Po wnikięciu do organizmu, na ogół przez błony śluzowe i wstępnej replikacji w komórkach nabłonkowych, wirus migruje do zakończeń neuronów czuciowych. Następnie na drodze transportu retrogradowego jest przenoszony do ciała komórek nerwowych w zwoju nerwu trójdzielnego. Tam ustanawia latencję, w trakcie której ekspresja jego genomu jest znacznie ograniczona, jednakże po zaistnieniu określonych warunków może dojść do reaktywacji wirusa i wznowienia produkcji wirionów potomnych. Ustanowienie zakażenia latentnego zapewnia zarówno przetrwanie wirusowego materiału genetycznego, jak i przeżycie zakażonej komórki (163).

Na poziomie molekularnym wnikanie HSV-1 do komórki jest trój etapowym procesem, zależnym od glikoprotein obecnych w osłonce wirusa. Pierwszy etap to wiązanie glikoproteiny gD z receptorem, którym może być siarczan heparanu, nektyna 1 i 2 lub białko HVEM (ang. *HerpesVirus Entry Mediator*). W następnej fazie, zależnej od gH i gL, lipidy błony komórkowej i otoczki wirusa ulegają wymieszaniu, aż do zajścia etapu trzeciego czyli całkowitej fuzji, w której pośredniczy gB (164, 165).

Wniknięcie HSV-1 do komórki wiąże się z uruchomieniem całego repertuaru mechanizmów zarówno wrodzonej, jak i nabytej odpowiedzi odpornościowej. Aktywacja wrodzonej odpowiedzi odpornościowej manifestuje się przede wszystkim produkcją interferonów typu I oraz aktywacją komórek NK. Za indukcję wydzielania interferonów

w przebiegu zakażeń HSV-1 odpowiedzialne są receptory rozpoznające wzorce, a wśród nich receptory Toll-podobne, a mianowicie TLR2, TLR9 oraz TLR3.

TLR2 rozpoznaje HSV-1 głównie w kompleksie z TLR1, aktywowanym najprawdopodobniej przez peptydy obecne w gB i gH, prezentowane w momencie fuzji komórki i wirusa. Co ciekawe, jedynie niewielka ilość klonów otrzymanych z laboratoryjnych szczepów HSV-1 lub izolatów klinicznych ma zdolność do aktywacji TLR2, a co za tym idzie wzbudzenia odpowiedzi zapalnej (166). Pokazano, że komórki mikroglejowe odpowiadają na infekcję HSV-1 szybką produkcją całego repertuaru cytokin prozapalnych, takich jak TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12 oraz chemokin, a także zwiększeniem ekspresji genu dla TLR2 (167). Z innych badań wynika, że delecja genu *Tlr2* u myszy prowadziła do znacznego zahamowania produkcji cytokin prozapalnych w odpowiedzi na HSV-1, ale także do obniżenia śmiertelności zainfekowanych osobników w porównaniu do myszy typu dzikiego. Co zaskakujące, przeżywalność myszy nie była związana z zahamowaniem replikacji wirusa, ale raczej z osłabieniem reakcji zapalnej (168). Podobny efekt obserwowano po wprowadzeniu HSV-1 do jelitowego układu nerwowego (ang. *Enteric Nervous System*, ENS) myszy. U osobników typu dzikiego dochodziło do wzmożonej produkcji cytokin prozapalnych, chemokiny CCL2, a w konsekwencji migracji makrofagów CD11b⁺, co prowadziło do zaburzeń motoryki jelit, natomiast u myszy z delecją *Tlr2* produkcja cytokin była upośledzona, a w zamian obserwowano napływ reaktywnych względem HSV-1 limfocytów T cytotoksycznych i mniejsze zaburzenia ze strony układu pokarmowego (169). Dane te wskazują, że niezbędna jest ścisła regulacja zależnej od TLR2 odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko HSV-1, gdyż jej nadmierna aktywacja może doprowadzić do niekontrolowanej produkcji cytokin i uogólnionej reakcji zapalnej.

Drugi związany z TLR mechanizm rozpoznawania HSV-1 uzależniony jest od aktywacji endosomalnego TLR9 przez materiał genetyczny wirusa, co wymaga internalizacji i degradacji kapsydów wewnątrz endosomu, ale nie jest warunkowane replikacją wirusa. Główną rolę w rozpoznawaniu HSV-1 przez TLR9 przypisuje się komórkom pDC, które po stymulacji wirusem wydzielają znaczne ilości interferonów typu I. Dane dotyczące innych populacji komórek w indukcji odpowiedzi odpornościowej przeciwko HSV-1 są kontrowersyjne (170, 171). Pokazano, że odpowiedź skierowana przeciwko HSV-1 generowana przez komórki dendrytyczne jest najprawdopodobniej dwustopniowa. Postulowano, że jej pierwszym etapem jest rozpoznanie HSV-1 na powierzchni komórki przez TLR2, co skutkuje między innymi wzmożoną fagocytozą, dojrzewaniem fagosomów, a w konsekwencji rozpoznaniem DNA uwolnionego ze zdegradowanych wirionów przez TLR9.

Ostatnim spośród TLR aktywowanym przez HSV-1 jest TLR3. Pokazano, że receptor ten może wiązać dsRNA powstałe jako forma pośrednia w trakcie replikacji wirusa (172).

Interesującym jest fakt, że syntetyczne ligandy TLR3 i TLR9 podane myszom przed infekcją HSV-1 miały działanie immunomodulujące, działały hamująco na replikację wirusa

w mózgu oraz wydzielanie cytokin zaburzających barierę krew mózg. W konsekwencji pełniły funkcję ochronną przed rozwojem HSE u myszy. Natomiast podanie antagonisty TLR9 po wprowadzeniu wirusa do organizmu myszy łagodziło przebieg wywołanej nim choroby i zmniejszało śmiertelność m.in. dzięki hamowaniu nadmiernej odpowiedzi zapalnej w mózgu (173). Podobny efekt obserwowano podczas badań *in vitro* z wykorzystaniem komórek dendrytycznych. Wykazano, że komórki stymulowane agonistami TLR3 (polyI:C) i TLR9 (CpG-A ODN) przed podaniem HSV-1 charakteryzowały się zmniejszonym obciążeniem wirusem i wzmożonym wydzielaniem IFN β .

Zdolność różnych typów TLR do rozpoznania odmiennych komponentów wirionów HSV-1 jest najprawdopodobniej strategią skutecznego wykrycia wirusa przez odrębne populacje komórek, prezentujące zróżnicowany repertuar tych receptorów (166). Dokładne poznanie mechanizmów zaangażowanych do usuwania wirusa z komórki może być podstawą do rozwoju nowych terapii antywirusowych.

4 CEL PRACY

Mal/TIRAP (ang. *MyD88 Adaptor Like/TIR Adaptor Protein*) jest białkiem umożliwiającym interakcję domen TIR receptorów TLR2 i TLR4 oraz białka MyD88 w przybłonowym przedziale komórkowym. Zauważono również, że białko Mal może pełnić funkcję negatywnego regulatora szlaku sygnałowego receptora Toll-podobnego 3, który w odróżnieniu od TLR2 i TLR4 zakotwiczony jest w błonie endosomu.

Jak dotąd, funkcja adaptora Mal w szlakach sygnałowych innych endosomalnych receptorów TLR, w tym receptora TLR9 nie została wyjaśniona.

Celem pracy było ustalenie funkcji, jaką Mal pełni w TLR9-zależnej odpowiedzi antywirusowej oraz poznanie nowych interakcji białka Mal z białkami szlaku sygnałowego receptora TLR9. Podjęto również próbę identyfikacji czynników transkrypcyjnych regulowanych przez białko Mal i determinujących inicjację transkrypcji cytokin aktywowanych przez receptor TLR9.

5 MATERIAŁY I METODY

5.1 MATERIAŁY

5.1.1 Odczynniki chemiczne i reagenty

Nazwa	Producent
2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
3-MA	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Bambanker™	Lymphotec Inc., Tokio, Japonia
Błękit bromofenolowy	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Błękit trypanu	Bio-Rad, Hercules, USA
Bromek heksadimetryny (Polybrene)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
BSA	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Chlorek amonu (NH ₄ Cl)	POCh, Gliwice, Polska
Chlorek magnezu (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Chlorek potasu (KCl)	POCh, Gliwice, Polska
Chlorek sodu (NaCl)	POCh, Gliwice, Polska
CpG-C-ODN (M362)	Invivogen, Tuluza, Francja
DPBS	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
DMSO (Dimetylosulfotlenek)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
DTT (Ditiotreitrol)	LOBA-Chemie, Wiedeń, Austria
D-Lucyferyna	Biosynth, Staad, Szwajcaria
EDTA (Wersenian disodowy)	POCH, Gliwice, Polska
Etanol	POCH, Gliwice, Polska
Fluorek sodu	POCH, Gliwice
FR180204	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Genetycyna (G418)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Gentamycyna	BioShop, Burlington, Kanada
Glicerol	POCH, Gliwice
Glicyna	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
HBSS	IITD PAN, Wrocław
HEPES	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
INH-1-ODN	Invivogen, Tuluza, Francja
Izopropanol	POCH, Gliwice, Polska
JSH-23	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Kazeina	BDH, Poole, Wielka Brytania
Koelenterazyna	Biosynth, Staad, Szwajcaria
Kwas borowy	POCH, Gliwice, Polska
Kwas cytrynowy	POCH, Gliwice, Polska

Kwas octowy	POCH, Gliwice, Polska
Kwas siarkowy	POCH, Gliwice, Polska
LB	BioShop, Burlington, Kanada
Lymphoprep™	Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Kanada
LPS (<i>E.coli</i>)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Midori Green Advance	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Niemcy
Medium DMEM/GlutaMAX	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Medium OptiMEM-I/Glutamax	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Medium RPMI 1640/GlutaMAX	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Mieszanina inhibitorów proteaz (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail)	Merck, Darmstadt, Niemcy
Mieszanina inhibitorów fosfataz (PhosSTOP™)	Merck, Darmstadt, Niemcy
Molekularne standardy cząsteczkowych mas białkowych (PageRuler Prestained Protein Ladder)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Molekularne standardy mas DNA (GeneRuler 100 bp DNA Ladder)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nadsiarczan amonu	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Oligonukleotyd konsensusowy NF-κB znakowany barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni (IRDye®700 NF-κB Consensus Oligonucleotide)	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Nitroceluloza	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Normocin	Invivogen, Tuluza, Francja
Oligonukleotydy	IBB PAN, Warszawa, Polska
PBS	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Peptyd blokujący Mal oraz peptyd kontrolny TIRAP (TLR2 and TLR4) Inhibitor peptide set	Novus Biologicals, Littleton, USA
Płodowa surowica bydłęca (FCS)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
PMSF (fluorek fenylometylosulfonylu)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Puromycyna	Invivogen, Tuluza, Francja
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe, Niemcy
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Roth, Karlsruhe, Niemcy
Sacharoza	POCH, Gliwice, Polska
SDS (dodecylosiarczan sodu)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Tpl2-inh	Calbiochem/Merck, Darmstadt, Niemcy
Triton X-100	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Trypsyna 10x	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Tween® 20	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
Złoże agarozowe z białkiem A/G (Protein a/G Plus-Agarose)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

5.1.2 Zestawy gotowe

Przeznaczenie	Nazwa	Producent
Zestaw do izolacji RNA	ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System	Promega GmbH, USA
Zestaw do odwrotnej transkrypcji	M-MLV Reverse Transcriptase	Promega GmbH, USA
Zestaw do reakcji PCR	REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich/Merck, Niemcy
Zestaw do reakcji PCR w czasie rzeczywistym	GoTaq® qPCR Master Mix	Promega GmbH, USA
Zestaw do testu EMSA	Odyssey® EMSA Buffer Kit	Li-COR Biosciences, Lincoln, USA
Zestaw do izolacji plazmidów	EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Niemcy

5.1.3 Bufory i żele

Nazwa	Skład
TAE	40 mM Tris 20m M kwas octowy 2 mM EDTA
HS	50 mM Tris-HCl, PH 7,5 5 M NaCl 0,5% Igepal 50 mM NaF 0,1 mM Na ₃ VO ₄ 10 µl/ml mieszaniny inhibitorów proteaz Complete mini 0,1 M PMSF 0,5 mM DTT 0,25% deoksychoalan sodu
Bufor do nanoszenia prób (Laemmli Sample Buffer)	0,25 M Tris-HCl, pH 6,8 6% SDS 40% sacharoza 0,04% błękit bromofenolowy 5% β-merkaptioetanol
Żel zagęszczający 5% (10 ml) do SDS-PAGE	H ₂ O 6,8 ml Rothiphorese® Gel 30 (37,5:1) 1,7 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 1,25 ml 10% SDS 0,1 ml 10% nadsiarczan amonu 0,1 ml TEMED 10 µl
Żel rozdzielający 12% (20 ml) do SDS-PAGE	H ₂ O 6,6 ml Rothiphorese® Gel 30 (37,5:1) 8,0 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 5,0 ml 10% SDS 0,2 ml 10% nadsiarczan amonu 0,2 ml TEMED 8 µl

Bufor elektrodowy do SDS-PAGE	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM glicyna 0,1 % SDS
Bufor do transferu	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM glicyna 20% metanol
TBS	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl
TBS-T	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05% Tween
Bufor A do izolacji frakcji komórkowych	10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 1 mM PMSF 0,1 mM Na ₃ VO ₄ 0,1% NP-40
Bufor B do izolacji frakcji komórkowych	20 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 420 mM NaCl 20% glicerol 1 mM DTT 1 mM PMSF
Bufor wiążący do EMSA, pH 7,5 (10 x)	100 mM Tris 500 mM KCl 10 mM DTT
Bufor elektrodowy do EMSA (20 x TBE)	Tris 54 g Kwas borowy 27,5 g 0,5 m EDTA pH 8,0 20 ml H ₂ O do 250 ml
Żel rozdzielający do EMSA 5% (40 ml)	H ₂ O 31 ml Rotiphorese® Gel 30 (29:1) 6,67 ml TBE 20x 1,0 ml 80% glicerol 1,5 ml 10% nadsiarczan amonu 0,3 ml TEMED 17,7 µl

5.1.4 Startery do PCR

Sekwencje starterów do badania ekspresji genów ludzkich i mysich

Gen	Sekwencje starterów	Długość fragmentu (pz)
<i>HPRT1</i>	F: 5'-TGGAGTCCTATTGACATCGCCAGT-3' R: 5'-AACAAATCCGCCCAAAGGGAACTGA-3'	193
<i>TLR9</i>	F: 5'-CAACCTCCCAAGAGCCT-3' R: 5'-TGCCATTGGTCAGGGCC-3'	106
<i>TIRAP</i>	F: 5'-TTCACCAATGCCTGGTCTC-3' R: 5'-CTGAACCAGTCAGCCATCTT-3'	122
<i>MYD88</i>	F: 5'-TCCACAGTGATGCCTACTGATGCT-3' R: 5'-ATGCAGATGAGAGGTGGACCCATT-3'	153
<i>IFNB1</i>	F: 5'-GCCGCATTGACCATCTATGA-3' R: 5'-GCCAGGAGGTTCTCAACAATAG-3'	103
<i>TNF</i>	F: 5'-CACCCTTCGAAACCTGGGA-3' R: 5'-CACTTCACTGTGCAGGCCAC-3'	51
<i>Hprt1</i>	F: 5'-GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG-3' R: 5'-CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT-3'	93
<i>Tlr9</i>	F: 5'-CAACCTCCCAAGAGCCT-3' R: 5'-TGCCATTGGTCAGGGCC-3'	139
<i>Tirap</i>	F: 5'-AGCGGAGAACAATCGCTCTACCAA-3' R: 5'-AGATCGGCATCTTCTTGGGCTTCT-3'	241
<i>Myd88</i>	F: 5'-TTCAGCATTTGGGAGGTAGAGGCA-3' R: 5'-GCGAAGCCAAACAGCTTCTCCTTT-3'	264
<i>Ifnb1</i>	F: 5'-GGAGATGACGGAGAAGATGC-3' R: 5'-CCCAGTGCTGGAGAAATTGT-3'	83
<i>Tnf</i>	F: 5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3' R: 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'	174

Przeciwciała

Nazwa	Opis	Producent
p-p44/42 MAPK	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie ERK1/2	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p44/42 MAPK	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ERK1/2	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-p38 MAPK	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie p38	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p38 MAPK	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko p38	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
I κ B α	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko I κ B α	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
p-p105	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie p105	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
NF- κ B1 p105	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko p50 i jego prekursorowi p105	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Nazwa	Opis	Producent
p-p100	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko ufosforylowanej formie p100	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
NF-κB2 p100	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko p52 i jego prekursorowi p100	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p65	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko p65	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
RelB	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko RelB	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
c-Rel	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko c-Rel	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
C23	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko białku C23 (nukleolinie)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
HA	Przeciwciała mysie skierowane przeciwko metce hemaglutyniny (HA)	Covance, Princeton, USA
Flag	Przeciwciała królicze skierowane przeciwko metce FLAG (polipeptyd DYKDDDDK)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Niemcy
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H+ L)	Drugorzędowe przeciwciała kozie skierowane przeciwko IgG królika, skoniugowane z barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni	Li-COR Biosciences, Lincoln, USA
IRDye® 680RD Donkey anti-Mouse IgG (H + L)	Drugorzędowe przeciwciała ośle skierowane przeciwko IgG myszy, skoniugowane z barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni	Li-COR Biosciences, Lincoln, USA

5.1.5 Plazmidy

5.1.5.1 Plazmidy systemu lentiwirusowego

System lentiwirusowy służący do wyciszenia genu *TIRAP* składał się z trzech wektorów:

1. pLKO.1-puro – plazmid zawierający sekwencję shRNA skierowaną przeciwko genowi *TIRAP* oraz gen oporności na puromycynę, izolowany z bakterii *E.coli* (MISSION® shRNA Bacterial Glycerol Stock) transformowanych wektorami kodującymi konkretne sekwencje, zakupionych z Sigma-Aldrich/ Merck.
2. pCMV-ΔR8.91 – plazmid pakujący zawierający geny wirusa HIV-1 kodujące Gag i polimerazę pod kontrolą promotora CMV (Addgene).
3. pMD2.G – plazmid zawierający gen kodujący białko otoczkowe VSV-G (Addgene).

Sekwencje shRNA podano poniżej.

Kontrolę stanowił pusty wektor (pLKO.1-puro, SCH001).

Nr identyfikacyjny	Sekwencja	Region mRNA <i>TIRAP</i>
TRCN0000005565	3'-CCGGGCCAGCCTGAAATAATATTTCTCG AGAAATATTATTTTCAGGCTGGGCTTTTT-5'	3'UTR
TRCN0000005566	3'-CCGGCGATTCATGTACTACGTCGATCTCG AGATCGACGTAGTACATGAATCGTTTTT-5'	CDS
TRCN0000005567	3'CCGGGCCTAAGAAGCCTCTAGGCAACTCG AGTTGCCTAGAGGCTTCTTAGGCTTTTT-5'	CDS
TRCN0000005568	3'-CCGGCCAGCGATGCTTCACAGCCTACTCG AGTAGGCTGTGAAGCATCGCTGGTTTTT-5'	CDS
TRCN00000010947	3'-CCGGTCAAAGAAGCTGTCATGCGTTCTCG AGAACGCATGACAGCTTCTTTGATTTTT-5'	CDS

5.1.5.2 Plazmidy systemu reporterowego

Wektory systemu reporterowego kodujące gen lucyferazy świetlika pod pełnym promotorem genu *IFNB1* lub jego poszczególnymi domenami regulatorowymi (pLuc-PRDI-III, pLuc-PRDII, pLuc-PRDIV) otrzymano dzięki uprzejmości Prof. Katherine A. Fitzgerald z Uniwersytetu Medycznego Massachusetts, Worcester, USA (174). Wektor kontrolny (phRG-B) kodujący lucyferazę Renilla (phRG-B) został zakupiony z firmy Promega.

5.1.5.3 Plazmidy do koimmunoprecypitacji

Plazmidy ekspresyjne wykorzystane do koimmunoprecypitacji otrzymano dzięki uprzejmości dr Sinéad Miggina z Narodowego Uniwersytetu Irlandii, Maynooth, Irlandia.

p3xFLAG-CMV10-Atg16L1 – plazmid kodujący gen białka Atg16L1 z metką Flag

pcDNA3.1-HA-Mal – plazmid kodujący gen białka Mal z metką hemaglutyniny

5.1.6 Kożuszki leukocyтарno-пłytkowe

Kożuszki leukocyтарno-пłytkowe do izolacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC), pochodzące od zdrowych dawców, otrzymywano z Wojskowego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa przy IV Wojskowym Szpitalu Klinicznym we Wrocławiu.

5.1.7 Linie komórkowe

Spis linii komórkowych wraz z opisem ich pochodzenia oraz stosowanych mediów hodowlanych podano w tabeli poniżej:

Linia komórkowa	Typ	Pochodzenie	Medium
BMDM WT (NR-9456)	Unieśmiertelnione makrofagi izolowane z myszy typu dzikiego	BEI Resources, USA	DMEM, 10% FBS, 100 µg/ml Normocin, 1 µl/ml Gentamicin
BMDM MalKO (NR-9459)	Unieśmiertelnione makrofagi izolowane z myszy z nokautem genu <i>Tirap</i>		
CHME-5	Ludzkie embrionalne komórki mikroglejowe	Instytut Pasteura, Francja	DMEM, 10% FBS, 100 µg/ml Normocin
HEK293T	Ludzkie komórki embrionalne z nerki posiadające duży antygen T wirusa SV40	Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych (ATCC)	DMEM, 10% FBS, 100 µg/ml Normocin
HEK293-TLR9	Ludzkie komórki embrionalne z nerki stabilnie transfekowane genem dla TLR9	Invivogen, Francja	DMEM, 10% FBS, 100 µg/ml Normocin, 500 µg/ml G418
B16-Blue™IFNα/β Cells	Mysie komórki czerniaka, stabilnie transfekowane genem reporterowym fosfatazy alkalicznej (SEAP)	Invivogen, Francja	DMEM, 10% FBS, 100 µg/ml Normocin, 100 µg/ml Zeocin

5.1.8 Wirus opryszczki pospolitej typu 1 (Herpes simplex virus-1)

Wirus HSV-1 szczep MacIntyre (ATTC VR-539™) otrzymano z Laboratorium Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

5.1.9 Aparatura i akcesoria

Aparat do elektroforezy agarozowej (Agagel Midi Wide)	Biometra, Niemcy
Aparat do elektroforezy białkowej Mini Protean®	Bio Rad, USA
Aparat do transferu Mini Trans-Blot	Bio-Rad, USA
Czytnik płytek LUMIstar OMEGA wraz z oprogramowaniem	BMG Labtech, Niemcy
Czytnik mikropłytek MR 5000	Dynatech Laboratories, USA
System do testów ELISA, E-LizaMat X-2 wraz z oprogramowaniem	DRG International, USA
Inkubator do hodowli komórkowych C 150	Binder, Niemcy
Jednorazowy sprzęt plastikowy: końcówki do pipet, płytki hodowlane, płytki polistyrenowe, szalki Petriego, próbówki	Eppendorf, Niemcy, Sarstedt, Niemcy, Nalgene Nunc/ThermoScientific USA

Komora laminarna klasy II LabGard ES	NuAire, USA
Licznik komórek TC20	Bio-Rad, USA
Mikroskop fluorescencyjny Axio Vert.A1	Carl Zeiss, Niemcy
Multiimager Typhoon 8600 wraz z oprogramowaniem	Amersham Pharmacia Biotech, Szwajcaria
Nanofotometr	Implen, Niemcy
Pipety automatyczne	Eppendorf, Niemcy
SepMate™ Probówki do izolacji PBMC	Stemcell Technologies Inc., Kanada
Skaner w zakresie podczerwieni Odyssey CLx Infrared Imaging System wraz z oprogramowaniem	LI-COR Biosciences, USA
System do Real-Time PCR CFX-Connect wraz z oprogramowaniem	Bio-Rad, USA
Termocykler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Niemcy
Wirówka 5804 R	Eppendorf, Niemcy
Wirówka stołowa bez chłodzenia (Mini spin)	Eppendorf, Niemcy
MS Office	Microsoft, USA

5.2 METODY

5.2.1 Otrzymywanie i hodowla komórek

5.2.1.1 Hodowle komórkowe

Komórki hodowano w mediach podanych w podrozdziale 5.1.9. Wszystkie hodowle prowadzono w butelkach hodowlanych o powierzchni 25 lub 75 cm² w inkubatorze Binder, w warunkach 37°C, 5% CO₂. Pasaże komórek wykonywano 2 razy w tygodniu z zastosowaniem roztworu 0,05% trypsyny, 0,02% EDTA w DPBS. Do eksperymentów wykorzystywano komórki z hodowli pomiędzy 2 a 10 pasażem lub w przypadku komórek transdukowanych shRNA hodowle pasażowane maksymalnie 5 razy. Do krioprezerwacji komórek stosowano medium osłonowe Bmbanker™ (Lymphotec Inc.).

5.2.1.2 Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) otrzymywano metodą wirowania w gradiencie gęstości. Krew rozcieńczano dwukrotnie PBS bez jonów wapnia i magnezu, po czym nawarstwiano na czynnik separujący Lymphoprep™ (StemCell Technologies) w probówkach do izolacji SepMate™ (StemCell Technologies) i wirowano przy 1200 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie zbierano fazę górną zawierającą PBMC. Zebrane komórki zawieszano w PBS z 2% FCS i 1mM EDTA i wirowano (5 minut, 600 x g, 20°C). Uzyskany supernatant odrzucano, a osad komórek przepłukiwano kilkakrotnie zimnym HBSS (5 minut, 300 x g, 4°C), w celu usunięcia płytek krwi. Tak przygotowane PBMC zawieszano

w medium hodowlanym RPMI 1640 + GlutaMAX z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej i antybiotyku Normocin i liczono przy użyciu licznika komórek TC20 (Bio-Rad). Żywotność komórek oceniano metodą barwienia błękitem trypanu. Eksperymenty prowadzono gdy żywotność komórek wynosiła min. 95%.

5.2.2 Przygotowywanie plazmidów

5.2.2.1 Transformacja bakterii chemikompetentnych

W celu uzyskania wektorów do transfekcji komórek eukariotycznych bakterie *E. coli* DH5 α (Subcloning Efficiency DH5alpha Chemically Competent *E. coli*, Thermo Scientific) transformowano plazmidowym DNA zgodnie z zaleceniami producenta. Do 50 μ l zawiesiny komórek bakteryjnych uprzednio rozmrożonych na lodzie dodawano 10 ng DNA, delikatnie mieszano i inkubowano na lodzie przez 30 minut. Po tym czasie stosowano szok termiczny przenosząc probówkę do łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 30 sekund, a następnie ochładzając na lodzie przez 2 minuty. Po tym czasie do komórek dodawano 950 μ l ogrzanej pożywki LB i inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 225 obrotów/minutę. Następnie zawiesiny wysiewano w różnej objętości na szalki hodowlane z LB z dodatkiem agaru i określonych antybiotyków selekcyjnych. Po całonocnej hodowli w temperaturze 37°C, z płytki pobierano czystą kolonię i wstępnie namnażano bakterie w 5 ml medium LB (4 godziny, 37°C). Następnie pobierano 1 ml zawiesiny i przenoszono do kolb hodowlanych zawierających 150 ml LB i inkubowano przez noc w 37°C. Po tym czasie z bakterii izolowano plazmidy.

5.2.2.2 Izolacja plazmidów z bakterii *E.coli* DH5 α

Izolację plazmidów przeprowadzano z zastosowaniem zestawu EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen), postępując ściśle wg zaleceń producenta.

Hodowlę bakterii wirowano przy 6000 x g przez 15 minut, w temperaturze 4°C. Komórki zawieszano w 10 ml buforu P1, następnie dodawano 10 ml buforu P2 i delikatnie mieszano. Inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Dodawano 10 ml buforu P3, dokładnie mieszano i przenoszono lizaty do dołączonych do zestawów filtrów strzykawkowych. Do uzyskanych filtratów dodawano 2,5 ml buforu ER, mieszano i inkubowano na lodzie przez 30 minut. Następnie płyn nanoszono na kolumny ze złożem i inkubowano w celu związania DNA. Kolumny płukano dwukrotnie buforem QC, a następnie DNA eluowano 15 ml buforu QN. Plazmidy precypitowano izopropanolem, a mieszaninę następnie wirowano przy 15000 x g przez 30 minut, w temperaturze 4°C. DNA płukano etanolem i ponownie wirowano w tych samych warunkach przez 10 minut. Uzyskane osady zawieszano w wodzie wolnej od DNaz. Stężenie

i czystość wyizolowanych plazmidów oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=260$ nm i $\lambda=280$ nm z użyciem nanofotometru Implen.

5.2.3 Wyciszanie ekspresji genu *TIRAP*

Gen *TIRAP* w komórkach CHME-5 wyciszano metodą shRNA z wykorzystaniem systemu lentiwirusowego trzeciej generacji postępując wg zmodyfikowanej metody opisanej przez Moffata i wsp. (175).

5.2.3.1 Otrzymywanie wektorów lentiwirusowych

Zawiesinę komórek HEK293-TN wysiewano na 6-dołkowe płytki hodowlane w gęstości 5×10^5 komórek/ml (1 ml/dołek) w medium DMEM. Na 4 godziny przed transfekcją wymieniano medium na DMEM bez antybiotyku z 7% FBS (1 ml/dołek). Następnie w medium OPTI-MEM (100 μ l) przygotowywano mieszaninę składającą się z 3 plazmidów: shRNA-pLKO.1 (1 μ g/dołek), pCMV-dR8.91 (1 μ g/dołek) pMD2G (0,1 μ g/dołek). Do mieszanin plazmidów dodawano 100 μ l roztworu kationowego odczynnika transfekcyjnego Lipofectamine 2000 przygotowanego również w medium OPTI-MEM, w stosunku DNA:Lipofectamine 2000 równym 1:2 (w/v). Probówkę krótko wstrząsano, mieszaniny inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, a następnie transfekowano komórki dodając po 200 μ l mieszaniny na dołek. Następnego dnia wymieniano medium hodowlane na DMEM z dodatkiem 30% FCS. Po 24 oraz 48 godzinach hodowli z nad komórek zbierano medium bogate w lentiwirusy. Medium wirowano przy 1250 rpm przez 5 minut w temperaturze pokojowej celem usunięcia pozostałości komórek. Supernatant porcjowano i przechowywano w temperaturze -80°C .

5.2.3.2 Transdukcja shRNA

Komórki CHME-5 wysiewano na płytki 6-dołkowe, w gęstości 2×10^5 komórek/dołek. Następnego dnia wymieniano medium hodowlane na DMEM z dodatkiem 8 μ g/ml bromku heksadimetryny i 25% medium wzbogaconego w lentiwirusy otrzymanego jak opisano w punkcie 5.2.2.1. Po całonocnej hodowli w temperaturze 37°C , w atmosferze 5% CO_2 medium wymieniano na świeże, bez dodatku lentiwirusów. Po następnych 24 godzinach rozpoczynano hodowlę z wykorzystaniem antybiotyku selekcyjnego Puromycyny w stężeniu 5 μ g/ml.

5.2.4 Analiza ekspresji genów

5.2.4.1 Stymulacja komórek

Komórki wysiewano na płytki 6-dołkowe po 5×10^5 lub 10^6 komórek/dołek w zależności od typu komórek, w odpowiednim medium hodowlanym i pozostawiano na 24 godziny

w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C. Następnie komórki poddawano stymulacji ligandami przez 4 godziny lub infekcji wirusem HSV-1 przez 8 godzin. W przypadku eksperymentów z użyciem inhibitorów, dodawane one były na 30-60 minut przed właściwą stymulacją.

5.2.4.2 Izolacja RNA

RNA z komórek izolowano korzystając z zestawu ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega) postępując zgodnie z zaleceniami producenta.

Po stymulacji z komórek usuwano medium i przepłukiwano DPBS. Komórki poddawano lizie przy użyciu buforu BL+TG, a otrzymane lizaty przenoszono do probówek typu Eppendorf, następnie dodawano izopropanol i wytrząsano przez 5 sekund. Lizaty przenoszono na kolumnienki ze złożem i wirowano przez 30 sekund. Wszystkie wirowania prowadzono przy 13000 x g w temperaturze pokojowej. Następnie kolumny przepłukiwano 500 µl buforu RNA Wash Solution i wirowano jak wyżej. W celu degradacji genomowego DNA na kolumny наносzono 30 µl buforu zawierającego deoksyrybonukleazę I (DNase Incubation Mix) i chlorek manganu. Inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie kolumny przepłukiwano 200 µl buforu Column Wash Solution i dwukrotnie buforem RNA Wash Solution (500 µl i 300 µl), ponownie wirowano. RNA eluowano наносząc na złożę wodę wolną od nukleaz (w objętości zależnej od ilości komórek pobranych do eksperymentu). Stężenie i czystość wyizolowanego RNA oznaczano spektrofotometrycznie, mierząc absorbancję przy długości fali $\lambda=260$ nm, $\lambda=280$ nm i $\lambda=320$ nm z użyciem NanoPhotometer® P 360 (Implen). RNA przechowywano w temperaturze -70°C lub bezpośrednio wykorzystywano do reakcji odwrotnej transkrypcji.

5.2.4.3 Odwrotna transkrypcja na matrycy RNA

Reakcję odwrotnej transkrypcji RNA prowadzono przy użyciu odwrotnej transkryptazy M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), postępując zgodnie z zaleceniami producenta. W pierwszym etapie przeprowadzano hybrydyzację starterów do RNA. W tym celu mieszaninę reakcyjną zawierającą 1 µg RNA i 0,5 µg starterów inkubowano w temperaturze 70°C przez 5 minut. Następnie próbki przenoszono na lód. Po schłodzeniu dodawano mieszaninę reakcyjną (7,3 µl), która przygotowywana była w buforze dostarczonym przez producenta (5 µl) i zawierała 1 mM deoksynukleotydów (dNTP) oraz 200 U odwrotnej transkryptazy. Reakcję prowadzono przez 40 minut w temperaturze 37°C, 40 minut w temperaturze 42°C, a następnie przerywano poprzez ogrzewanie mieszaniny przez 10 minut w 70°C. Po tym czasie próbki przenoszono na lód i dodawano do nich 25 µl wody wolnej od nukleaz. Otrzymane preparaty cDNA przechowywano w temperaturze -20°C lub bezpośrednio wykorzystywano w reakcji PCR.

5.2.4.4 Amplifikacja swoistych fragmentów DNA metodą PCR

Klasyczną reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler Gradient (Eppendorf) z wykorzystaniem polimerazy DNA RedTaq (Sigma) zgodnie z zaleceniami producenta.

Mieszanina reakcyjna o końcowej objętości 25 μ l zawierała 3,5 μ l matrycy, którą stanowiło cDNA, po 0,5 μ M specyficznych starterów F i R, 2,5 μ l 10x buforu do reakcji, po 200 μ M dNTP oraz wodę wolną od nukleaz.

Etapy reakcji PCR:

1. Wstępna denaturacja: 3 minuty, 95°C;
 2. Denaturacja: 30 sekund, 95°C;
 3. Łączenie starterów: 60 sekund, 60°C;
 4. Synteza: 60 sekund, 72°C;
 5. Końcowa elongacja: 5 minut, 72°C;
- Etapy 2-4 powtarzano 40 razy.

Sekwencje zastosowanych starterów oraz długości amplifikowanych fragmentów podano w rozdziale *Materiały i metody* punkt 5.1.3. Produkty reakcji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym przygotowanym w buforze TAE, z dodatkiem barwnika Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe). Próbki zawierające 10 μ l produktu PCR z dodatkiem 2 μ l buforu obciążającego Loading Dye (Thermo Scientific™) oraz standard długości fragmentów (Gene Ruler 100bp) poddawano elektroforezie w aparacie Agagel Mini-Wide (Biometra), przy napięciu 12V/cm, w buforze TAE. Obrazowanie w zakresie promieniowania UV przeprowadzono wykorzystując Typhoon Imager 8600.

5.2.4.5 Amplifikacja swoistych fragmentów DNA metodą PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono z wykorzystaniem aparatu CFX Connect™ Real-Time PCR Detection (Bio-Rad), natomiast mieszaninę reakcyjną przygotowywano stosując gotowy zestaw GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Mieszanina reakcyjna (10 μ l) zawierała 5 μ l MasterMix, po 1,25 μ l swoistych starterów (w końcowym stężeniu 0,5 μ M każdy) oraz 2,5 μ l matrycy cDNA (10-20 ng w zależności od rodzaju komórek). W celu wykluczenia zanieczyszczenia preparatu genomowym DNA, prowadzono kontrolną reakcję amplifikacji, w której jako matrycę stosowano RNA, który nie był poddany odwrotnej transkrypcji (RT-).

Sekwencje zastosowanych starterów oraz długości amplifikowanych fragmentów podano w rozdziale *Materiały i metody* punkt 5.1.3.

Etapy reakcji PCR:

1. Aktywacja polimerazy: 10 minut, 95°C;
 2. Denaturacja: 10 sekund, 95°C;
 3. Łączenie starterów: 15 sekund, 60°C;
 4. Synteza: 15 sekund, 72°C;
- Etapy 2-4 powtarzano 40 razy.

Odczyty fluorescencji zbierane były po etapie elongacji. Analiza ekspresji badanych genów prowadzona była z zastosowaniem metody 2-($\Delta\Delta$ CT) względem genu referencyjnego – fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (*HPRT1*). Specyficzność wiązania starterów analizowano na podstawie krzywych topnienia produktów reakcji.

5.2.5 Western Blotting**5.2.5.1 Stymulacja komórek i przygotowanie lizatów**

Komórki wysiewano na płytki 6-dołkowe w gęstości 5×10^5 - 1×10^6 /dołek w zależności od ich typu i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie komórki stymulowano przez odpowiedni czas ligandami w obecności lub przy braku specyficznych inhibitorów. Po stymulacji usuwano medium z nad komórek i trzykrotnie przepłukiwano je DPBS ogrzanym do temperatury 37°C. Lizę komórek przeprowadzano, w zależności od typu eksperymentu, w buforze HS lub HS-Laemmli. W przypadku badania białek ufosforylowanych do buforu lizującego dodawana była mieszanina inhibitorów fosfataz PhosStop (10 μ l/ml buforu). Na dołek płytki dodawano 90 μ l buforu HS lub 150 μ l HS-Laemmli i inkubowano 20 minut na lodzie. Do lizatów przygotowywanych w HS dodawano bufor do nanoszenia prób (4:1; v/v). Próbki denaturowano przez 5 minut w 100°C i schładzano.

5.2.5.2 SDS-PAGE

Elektroforetyczny rozdział białek wraz ze standardami mas prowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących według Laemmli'ego (176). Elektroforezę prowadzono w aparacie Mini Protean (Bio-Rad) w buforze elektrodowym przy natężeniu prądu 25 mA i napięciu 100 V dla żelu zagęszczającego oraz 200 V dla żelu rozdzielającego.

5.2.5.3 Elektrotransfer białek

Transfer białek na membranę nitrocelulozową prowadzono w aparacie Mini Trans-Blot (Bio-Rad) przez 2 godziny przy napięciu 200 V i natężeniu 200 mA. Następnie, w celu zablokowania oddziaływań nieswoistych, membranę nitrocelulozową z immobilizowanymi białkami blokowano w 1% roztworze kazeiny w TBS-T przez 2 godziny i dwukrotnie płukano buforem TBS-T przez 10 minut oraz jednokrotnie buforem TBS.

5.2.5.4 Detekcja białek immobilizowanych na błonie nitrocelulozowej

Wyplukaną membranę inkubowano przez noc w temperaturze 4°C w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych, skierowanych przeciwko badanym białkom w 1% roztworze kazeiny w TBS-T, w rozcieńczeniach zalecanych przez producenta. Po upływie tego czasu błonę nitrocelulozową płukano TBS-T (1x10 minut) oraz TBS (2x10 minut), po czym inkubowano w temperaturze pokojowej z roztworem przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym. Po godzinnej inkubacji powtarzano procedurę płukania membrany, a następnie dokonywano pomiaru fluorescencji z wykorzystaniem skanera podczerwieni Odyssey CLx Infrared Imaging System (LI-COR).

5.2.6 Analiza reporterowa (Dual-Luciferase Reporter Assay, DLR)

Badanie zmian aktywacji transkrypcji przeprowadzono z wykorzystaniem systemu reporterowego DLR. Metoda ta polega na jednoczesnym pomiarze aktywności dwóch lucyferaz, świetlika i gąbki morskiej (*Renilla*). Gen lucyferazy świetlika znajduje się poniżej regionu promotorowego zawierającego badany element odpowiedzi, natomiast gen lucyferazy *Renilla* jest kontrolowany przez promotor konstytutywnie aktywny.

W celu zbadania aktywności regionu promotorowego interferonu β stosowano plazmidy kodujące gen lucyferazy świetlika pod kontrolą odpowiedniej domeny regulatorowej (PRD) lub pełnego promotora genu *IFNBI*. Badanie aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B przeprowadzono z wykorzystaniem wektora kodującego pięciokrotnie powtórzoną sekwencję wiązania tego czynnika.

5.2.6.1 Transfekcja

Komórki linii HEK-TLR9 wysiewano na płytki 96-dołkowe w ilości 5×10^4 komórek/dołek w 180 μ l medium hodowlanego i inkubowano przez 24 godziny, w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Następnego dnia przygotowywano mieszaninę plazmidów, na którą składały się: plazmid reporterowy (80 ng), plazmid kontrolny (40 ng), wektor ekspresyjny kodujący *TIRAP* (10 ng lub 20 ng) oraz pusty wektor (80 ng, 40 ng lub 20 ng) zawieszony w medium OPTI-MEM (Gibco). Następnie do mieszaniny DNA dodawano odczynnik Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) w stosunku 1:1 (w/v), uprzednio rozcieńczony w medium OPTI-MEM. Komórki poddawano transfekcji dodając 20 μ l mieszaniny transfekcyjnej/dołek i inkubowano przez kolejne 16 godzin w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂.

5.2.6.2 Pomiar aktywności lucyferazy

Komórki infekowano HSV-1 (MOI 1) przez 8 godzin. Po tym czasie usuwano medium, do każdego dołka dodawano 55 μ l buforu PLB i mrożono płytkę w temperaturze -80°C .

Po rozmrożeniu odpipetowywano po 20 μ l lizatów do dwóch płytek testowych i dodawano po 40 μ l substratu dla lucyferazy świetlika, D-Lucyferyny (Biosynth) lub lucyferazy gąbki morskiej, koelenterazyny (Biosynth). Pomiar luminescencji przeprowadzano przy pomocy czytnika LUMIstar Omega (BMG Labtech).

Aktywność lucyferazy świetlika (FLU) normalizowano do lucyferazy gąbki morskiej (RLU). Wynik przedstawiano jako krotność kontroli.

5.2.7 Test zmiany ruchliwości elektroforetycznej (EMSA)

Do badania translokacji cytoplazmatyczno-jądrowej wykorzystano test EMSA, opierający się na opóźnieniu ruchliwości elektroforetycznej znakowanych sond oligonukleotydowych na skutek wiązania się do nich odpowiednich czynników transkrypcyjnych.

5.2.7.1 Stymulacja komórek i przygotowanie frakcji komórkowych

Zawiesinę komórek o gęstości 5×10^5 komórek/ml wysiewano na płytce 6-dołkowej, po 2 ml/dołek i inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO_2 . Następnie komórki stymulowano przez 60-120 minut odpowiednimi ligandami. Po tym czasie medium usuwano, a komórki dwukrotnie przepłukiwano PBS bez jonów wapnia i magnezu. Następnie komórki poddawano lizie w buforze A i inkubowano na lodzie przez 15 minut. Po tym czasie lizaty przenoszono do probówek typu Eppendorf i wirowano przy $12000 \times g$ przez 1 minutę, w temperaturze 4°C . Supernatanty (frakcja cytozolowa) usuwano, a osad (jądra komórkowe) zawieszano w buforze B, w objętości stanowiącej trzykrotną objętość osadu. Próbkę wytrząsano przez 30 minut w temperaturze 4°C , po czym wirowano przy $12000 \times g$ przez 10 minut w temperaturze 4°C . Supernatanty, stanowiące ekstrakty jądrowe, zachowywano do dalszych badań.

5.2.7.2 Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka w badanych próbkach oznaczano metodą Bradforda (177). Do próbek o objętości 2 μ l dodawano 200 μ l odczynnika Bradforda (8,5% kwas ortofosforowy, 5% etanol, 0,01% błękit kumaryny G-250). Płytkę inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie odczytywano absorbancję przy długości fali $\lambda=550$ nm przy pomocy czytnika Dynatech MR-5000. Stężenie białka wyznaczano na podstawie krzywej kalibracyjnej, do przygotowania której stosowano wzorcowe roztwory BSA zawierające od 1 do 15 μg białka.

5.2.7.3 Przeprowadzenie testu

Do przeprowadzenia testu EMSA wykorzystano zestaw Odyssey EMSA Buffer Kit (LI-COR Biosciences) postępując zgodnie z zaleceniami producenta.

Fracje jądrowe (10 µg białka) inkubowano z dwuniciową sondą oligonukleotydową (50 fmol; 1 µl) posiadającą konsensusową sekwencję wiążącą czynnik transkrypcyjny NF-κB, 5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3', znakowaną na końcach barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni (IRDye 700). Mieszaninę reakcyjną przygotowano w buforze wiążącym z dodatkiem Poly(dI•dC) (1 µg/µL w 10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 7,5; 1 µl) w celu wysycenia białek nieswoiście oddziałujących z DNA, DTT (25 mM; 2 µl) i uzupełniano wodą do końcowej objętości 20 µl. Inkubację prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Następnie do próbek dodawano 1 µl buforu obciążającego (10x Orange loading dye) i nanoszono na żel. Rozdziału elektroforetycznego dokonywano w 5% natywnym żelu poliakryloamidowym, w 0,5 x TBE, przy natężeniu prądu 25 mA i napięciu 300 V w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Obecność kompleksów NF-κB-DNA analizowano z wykorzystaniem skanera w zakresie podczerwieni Odyssey CLx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

5.2.8 Test biologiczny do oznaczenia Interferonów typu I

Oznaczenie biologicznie aktywnych interferonów typu I przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnej linii komórkowej B16-BlueTM IFNα/β (Invivogen). Linia ta została uzyskana poprzez stabilną transfekcję komórek B16 genem reporterowym kodującym wydzielniczą płodową fosfatazę alkaliczną (SEAP) pod kontrolą indukowalnego przez IFNα/β promotora ISG54 wzmocnionego sekwencjami ISRE.

5.2.8.1 Przeprowadzenie testu

Oznaczenie przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta. Komórki BMDM wysiewano na płytki hodowlane w gęstości 5×10^5 komórek/ml medium hodowlanego i po całonocnej hodowli (37°C, 5% CO₂) stymulowano określonymi ligandami. Komórki B16-BlueTM IFNα/β wysiewano w gęstości $4,2 \times 10^5$ komórek/ml i dodawano 20 µl nadsącza znad stymulowanych komórek BMDM, a następnie inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Jako kontrolę pozytywną testu stosowano 20 µl poly(I:C). Kontrolę negatywną stanowiło 20 µl medium DMEM. Pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda=630$ nm dokonywano na 96-dołkowej płytce w mieszaninie 20 µl znad komórek B16-BlueTM IFNα/β i 180 µl medium QUANTI-BlueTM (Invivogen) wykorzystując czytnik mikropłytek Dynatech MR-500.

5.2.9 Oznaczanie poziomu TNF α

5.2.9.1 Stymulacja komórek

Komórki BMDM wysiewano na płytki 6-dółkowe w gęstości 5×10^5 komórek/ml i inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Następnie komórki stymulowano ligandami receptorów TLR przez 16 godzin.

5.2.9.2 Przeprowadzenie testu ELISA

Pomiar stężenia TNF α wydzielonego do medium hodowlanego przeprowadzano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu zestawu TNF α DuoSet ELISA (R&D Systems), stosując robot E-LizaMat X-2 (DRG International), zgodnie z zaleceniami producentów. Na 96-dółkową płytkę testową nanoszono po 100 μ l przeciwciała opłaszczającego (w stężeniu 800 ng/ml) i inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej. Następnie płytkę płukano dwukrotnie 0,2% roztworem kazeiny w PBS, jednokrotnie PBS i opłaszczano roztworem blokującym celem uniknięcia niespecyficznego wiązania białek. Płytkę inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej, a po usunięciu roztworu płukano jak poprzednio. Na tak przygotowane studzienki dodawano w dwóch powtórzeniach po 100 μ l badanej próby lub standardu TNF α o określonym stężeniu (31,5 – 2000 ng/ml) i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie płyn usuwano, a płytkę płukano jak wcześniej. Do studzienek nanoszono po 100 μ l biotynylowanych przeciwciał do detekcji (w stężeniu 75 ng/ml) i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Płytkę ponownie płukano, następnie dodawano po 100 μ l/dółek roztworu (1:40 v/v) streptawidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową (HRP) i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Po usunięciu koniugatu płytkę płukano i inicjowano reakcję barwną poprzez dodanie 100 μ l/dółek roztworu substratu dla HRP (1,35 mM tetrametylobenzydyny w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym, pH 5,0). Płytkę inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Reakcję przerywano dodając do studzienek po 50 μ l 2N H₂SO₄, a następnie mierzono absorbancję roztworów przy długości fali $\lambda=450$ nm. Stężenie TNF α określano na podstawie krzywej kalibracyjnej.

5.2.10 Badanie oddziaływania białka Mal z białkiem Atg16L

Badanie oddziaływania białek Mal i Atg16L przeprowadzono metodą koimmunoprecypitacji, polegającą na wyodrębnianiu kompleksów białkowych za pomocą specyficznych przeciwciał wiązanych do złoża agarozowego sprzężonego z białkiem A lub G.

5.2.10.1 Transfekcja przejściowa komórek i przygotowanie lizatów

Zawiesinę komórek HEK-TLR9 o gęstości 5×10^5 komórek/ml wysiewano na płytkę 6-dołkową w objętości 2 ml/dołek. Komórki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO_2 .

Następnego dnia przygotowywano mieszaninę transfekcyjną w medium OPTI-MEM (o objętości 100 μl /dołek) składającą się z plazmidów kodujących białka: Mal z metką HA (1 μg /dołek) oraz Atg16L1 z metką Flag (1 μg /dołek). Dodatkowo dla obu wektorów ekspresyjnych sporządzono mieszaniny kontrolne zawierające 1 μg /dołek plazmidu kodującego badane białko oraz pusty wektor (EV, 1 μg /dołek) w celu wyrównania ilości DNA użytego do transfekcji. Następnie do mieszaniny DNA dodawano odczynnik Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) w stosunku 1:1 (w/v), uprzednio rozcieńczony w medium OPTI-MEM. Komórki poddawano transfekcji dodając 1 ml mieszaniny transfekcyjnej/dołek.

Po transfekcji komórki inkubowano przez noc w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO_2 , po czym stymulowano HSV-1 przez 2 godziny. Następnie medium usuwano, a komórki przepłukiwano PBS i poddawano lizie poprzez dodanie 120 μl wysokosolnego buforu HS. Płytkę inkubowano na lodzie przez 20 minut. Po tym czasie lizaty komórkowe przenoszono do probówek typu Eppendorf i wirowano przez 5 minut przy $12000 \times g$. Uzyskane supernatanty wykorzystano w kolejnym etapie.

5.2.10.2 Koimmunoprecypitacja

90 μl supernatantu przenoszono do nowej probówki i dodawano 1 μl przeciwciała anti-Flag lub 2 μl przeciwciała 101r (anty-HA). Tak przygotowane próbki umieszczono na rotatorze i inkubowano przez noc w temperaturze 10°C . Kolejne 20 μl supernatantu zachowywano jako kontrolę ekspresji plazmidów.

Po inkubacji do mieszanin dodawano po 20 μl złoża agarozowego sprzężonego z białkami A/G i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, w celu wyodrębnienia kompleksów białkowych z przeciwciałami. Po tym czasie złoża agarozowe ze związanymi białkami przepłukiwano trzykrotnie buforem HS (1 ml) i wirowano przy $300 \times g$ przez 3 minuty. Po ostatnim wirowaniu dokładnie zbierano i odrzucano supernatant, a do osadu dodawano 25 μl buforu do nanoszenia prób (HS-Laemmli). Następnie próby denaturowano przez 5 minut w temperaturze 100°C , krótko wirowano i nanoszono na żel poliakryloamidowy razem z pobranymi wcześniej próbami pełnych lizatów komórkowych. Detekcję białek przeprowadzano metodą Western Blotting z wykorzystaniem przeciwciał anti-HA w przypadku koimmunoprecypitatów, oraz anti-HA i anti-Flag w przypadku pełnych lizatów komórkowych.

5.2.11 Analiza statystyczna

Wyniki przedstawione w pracy wyrażono jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe (SD), z co najmniej trzech niezależnych powtórzeń. Różnice między dwoma badanymi grupami oceniano posługując się testem t-Studenta. Za statystycznie istotną przyjęto wartość $p < 0,05$. Wartość $p < 0,001$ oznaczano (*), natomiast $p < 0,05$ (**). Obliczenia oraz graficzne przedstawienie wyników wykonano korzystając z programu MS Excel.

6 WYNIKI

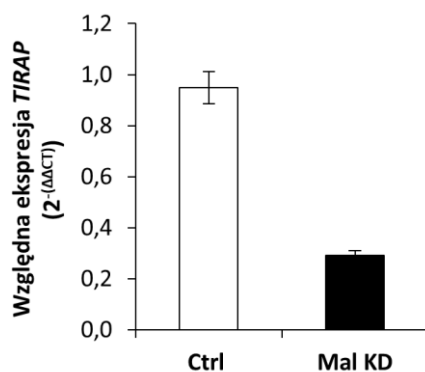
6.1 BADANIE ROLI BIAŁKA ADAPTOROWEGO MAL W ZALEŻNEJ OD TLR9 ODPOWIEDZI ANTYWIRUSOWEJ W MIKROGLEJU

Badania dotyczące udziału białka Mal w szlakach sygnałowych receptorów Toll-podobnych od początku skupiały się na wyjaśnieniu jego roli w ścieżkach receptorów związanych z błoną komórkową, negując tym samym jego pośrednictwo w przekazywaniu sygnału od TLR endosomalnych. Tłumaczono to głównie różnicami w budowie owych błon i braku potencjalnej przeszkody w wiązaniu się adaptora MyD88 do domeny TIR receptorów endosomalnych.

W 2010 roku pokazano jednak, że Mal uczestniczy w przekazywaniu sygnału od TLR3, który występuje głównie w błonie endosomalnej. Jednakże w odróżnieniu od TLR kotwiczonych w błonie komórkowej, sygnał płynący od TLR3 regulowany jest przez Mal negatywnie. Jest to swoisty ewenement w przypadku receptorów TLR. Dlatego też postanowiono ponownie rozważyć udział białka Mal w szlaku innego endosomalnego receptora, a mianowicie TLR9.

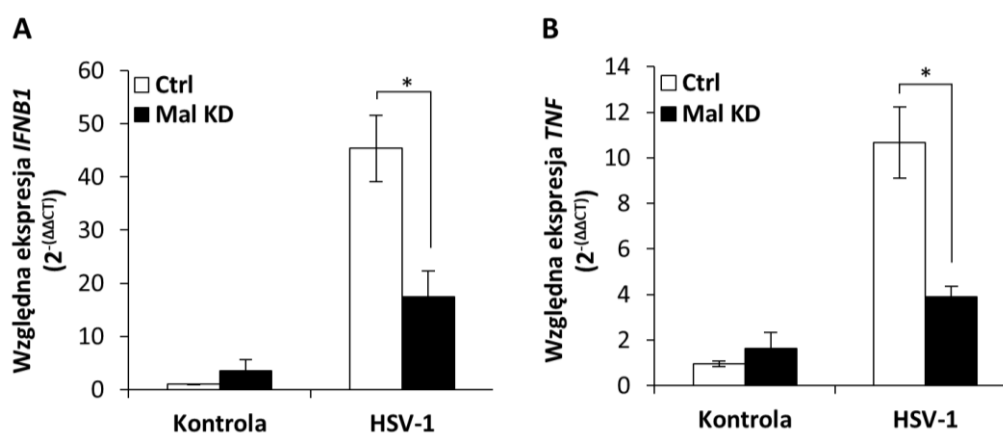
Receptor ten aktywowany jest między innymi materiałem genetycznym wirusa opryszczki typu I (HSV-1). HSV-1 jest wirusem neurotropowym i może powodować opryszczkowe zapalenie mózgu, które jest najpowszechniej występującym rodzajem infekcji wirusowej ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Pierwszą linią obrony OUN przed patogenami są komórki mikrogleju, będące makrofagami rezydentnymi mózgu. Komórki te mają zdolność do fagocytozy, a ponadto wydzielają cytokiny i chemokiny jeszcze przed napływem limfocytów.

Z tego względu do badań nad udziałem białka Mal w szlaku sygnałowym zależnym od receptora TLR9 wykorzystano komórki linii CHME-5 otrzymane z ludzkiego mikrogleju embrionalnego. W pierwszym etapie wyciszono w tych komórkach ekspresję genu *TIRAP* kodującego białko Mal stosując lentiwirusowy system shRNA, zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale Materiały i metody. Następnie, po hodowli komórek z antybiotykiem selekcyjnym (Puromycyną) weryfikowano poziom transkryptu dla *TIRAP* przy użyciu metody qPCR. Zaobserwowano, że w komórkach transdukowanych shRNA komplementarnym do *TIRAP* ekspresja genu kodującego białko Mal została obniżona względem komórek traktowanych kontrolnym shRNA (Ryc. 6.1.1.).



Ryc. 6.1.1. Wyciszenie ekspresji Mal w komórkach CHME-5. Komórki linii CHME-5 transdukowano shRNA skierowanym przeciwko genowi *TIRAP* (Mal KD) lub kontrolnym shRNA (Ctrl). Po hodowli z antybiotykiem selekcyjnym Puromycyną z komórek izolowano całkowite RNA i oznaczano względny poziom ekspresji *TIRAP*. Jako gen referencyjny zastosowano *HPRT1*.

W kolejnym etapie, w celu określenia różnicy w rozwijaniu odpowiedzi odpornościowej między komórkami z wyciszonym genem dla białka Mal (MalKD) i komórkami kontrolnymi (Ctrl), obie populacje komórek infekowano wirusem HSV-1. Zaobserwowano, że komórki MalKD charakteryzują się upośledzeniem odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko wirusowi HSV-1, co manifestowało się obniżeniem poziomu mRNA dla interferonu β oraz TNF α . Uzyskany wynik sugeruje, że białko Mal jest wymagane do przekazywania sygnału od TLR9 aktywowanego HSV-1 w komórkach CHME-5 (Ryc. 6.1.2.).1

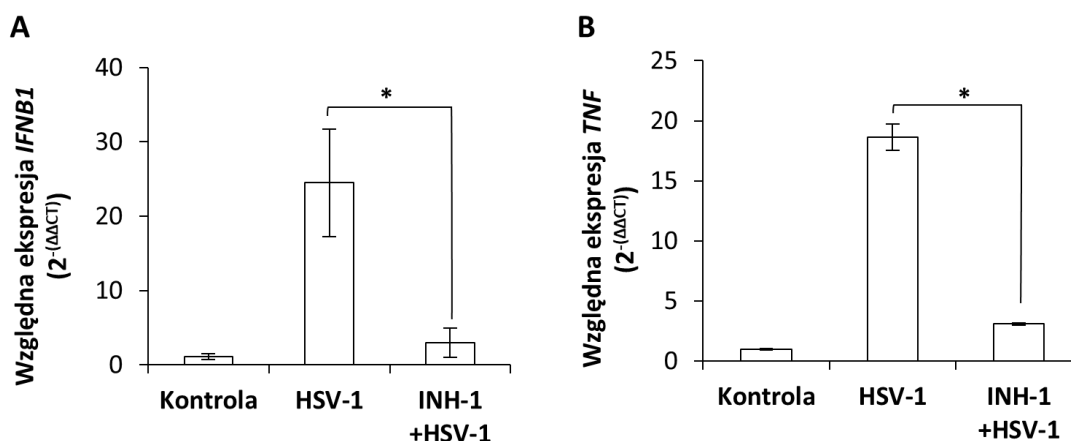


Ryc. 6.1.2. Ekspresja *IFNBI* i *TNF* w komórkach CHME-5 infekowanych wirusem HSV-1. Komórki z wyciszoną ekspresją *TIRAP* oraz komórki kontrolne infekowano wirusem HSV-1 (MOI 1) przez 8 godzin. Następnie izolowano całkowite RNA i oznaczano względny poziom ekspresji *IFNBI* (A) i *TNF* (B). Ekspresję genów badano z wykorzystaniem techniki qPCR. Poziom transkryptu oznaczano wg metody 2^{-(ΔΔCT)}. Jako gen referencyjny zastosowano *HPRT1*. * p<0,001

Z danych literaturowych wynika, że wirus opryszczki pospolitej typu I ma zdolność do aktywacji innych receptorów z rodziny Toll-podobnych m.in. TLR4, TLR2 lub cytozolowych receptorów kwasów nukleinowych, takich jak DAI. Dla potwierdzenia, że w komórkach CHME-5 proces indukcji odpowiedzi odpornościowej przez HSV-1 jest zależny od receptora

TLR9 zastosowano specyficzny oligonukleotyd blokujący ten receptor – cpg ODN. Komórki wstępnie inkubowano z INH-1 ODN, a następnie zainfekowano HSV-1.

Zauważono, że w komórkach traktowanych HSV-1 w obecności INH-1 ODN nie dochodziło do indukcji ekspresji genu *IFNB1* oraz *TNF*, co potwierdza, że ekspresja cytokin wywołwana przez HSV-1 w komórkach CHME-5 jest zależna od TLR9 (Ryc. 6.1.3.).

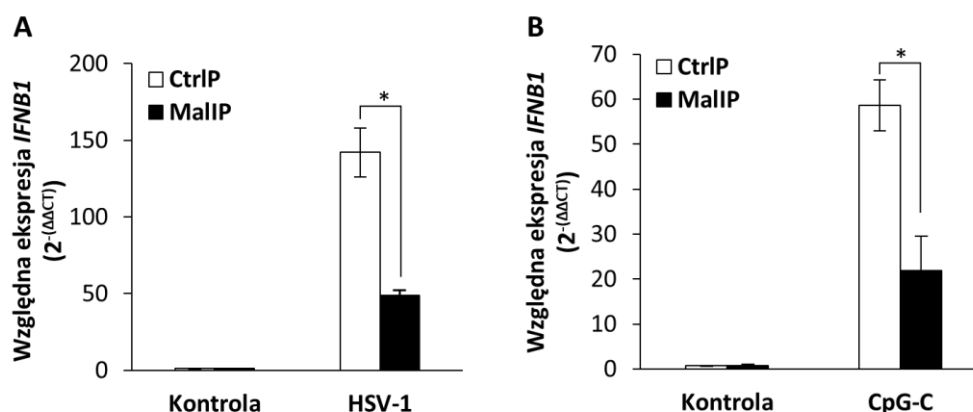


Ryc. 6.1.3. Kontrola swoistości aktywacji receptora TLR9 przez HSV-1. Komórki CHME-5 zainfekowano HSV-1 (MOI 1) przez 8 godzin, przy braku lub w obecności INH-1 ODN (10 μ M), dodanego 1 godzinę przed infekcją. Następnie izolowano RNA i oznaczano względną ekspresję *IFNB1* (A) i *TNF* (B). Ekspresję genów badano z wykorzystaniem techniki qPCR, a poziom transkryptu oznaczano wg metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Jako gen referencyjny zastosowano *HPRT1*. * $p < 0,001$

6.2 BADANIE ZALEŻNEJ OD MAL REGULACJI ODPOWIEDZI ANTYWIRUSOWEJ W JEDNOJĄDRZASTYCH KOMÓRKACH KRWI OBWODOWEJ

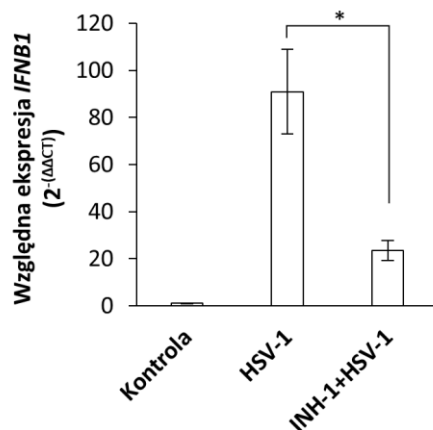
Dla potwierdzenia wyników otrzymanych z zastosowaniem linii komórkowej CHME-5 analogiczne eksperymenty przeprowadzono na komórkach pierwotnych – ludzkich jednojądrzastych komórkach z krwi obwodowej (PBMC). Jako agonistę TLR9, oprócz HSV-1, zastosowano ligand syntetyczny – oligonukleotyd o strukturze C, bogaty w niemetylowane wyspy CpG (CpG-C-ODN). Zastosowanie liganda syntetycznego miało na celu wykluczenie możliwych efektów niespecyficznych wywołanych przez inne receptory aktywowane HSV-1. Aby określić rolę białka Mal w badanym szlaku wykorzystano peptyd inhibitorowy (MalIP), który cechuje się wysokim powinowactwem do domeny TIR receptorów TLR blokując tym samym dostęp dla białka adaptorowego Mal i uniemożliwiając dalsze przekazanie sygnału płynącego od receptora. Peptyd ten zawiera dodatkowo sekwencję aminokwasową PTD (ang. *Protein Transduction Sequence*) pochodzącą z białka antennapedia muszki owocowej, determinującą jego transport przez błonę do wnętrza komórki. Jako kontrolę zastosowano peptyd obejmujący jedynie sekwencję PTD (CtrlP).

PBMC stymulowano HSV-1 lub CpG-C z jednoczesnym zastosowaniem peptydu blokującego białko Mal lub peptydu kontrolnego. Zaobserwowano, że w komórkach, które przed stymulacją agonistą TLR9 traktowane były MalIP, ekspresja genu kodującego interferon β uległa obniżeniu w porównaniu z komórkami preinkubowanymi z CtrlP (Ryc. 6.2.1.).



Ryc. 6.2.1. Ekspresja genu *IFNB1* w ludzkich PBMC traktowanych CpG-C ODN lub HSV-1 w obecności peptydu blokującego Mal. Komórki PBMC traktowano peptydem blokującym Mal (MalIP) lub peptydem kontrolnym (CtrlP) przez 24 godziny. Następnie komórki stymulowano HSV-1 lub CpG-C ODN przez odpowiednio 8 lub 4 godziny. Z komórek izolowano całkowite RNA i poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji. Poziom transkryptu dla $IFN\beta$ oznaczano metodą qPCR. Jako gen referencyjny stosowano *HPRT1*. * $p < 0,001$

W celu zbadania swoistości aktywacji receptora TLR9 przez wirus HSV-1 w komórkach PBMC, podobnie jak w przypadku komórek CHME-5, zastosowano specyficzny oligonukleotyd INH-1 ODN, blokujący badany receptor. Zaobserwowano, że indukcja ekspresji genu kodującego interferon β została osłabiona w komórkach uprzednio traktowanych INH-1 ODN w porównaniu z komórkami infekowanymi HSV-1 bez użycia inhibitora, co wskazuje, że wirus opryszczki typu I aktywuje TLR9 w komórkach PBMC (Ryc.6.2.2.).

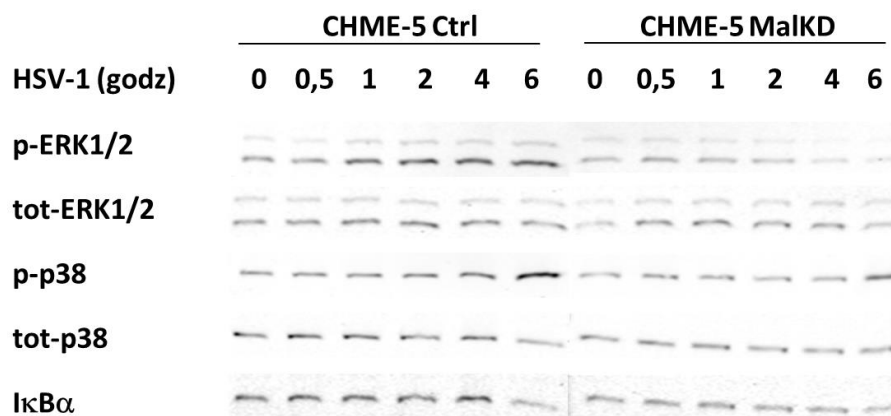


Ryc. 6.2.2. Kontrola swoistości aktywacji receptora TLR9 przez HSV-1 w komórkach PBMC. Komórki PBMC infekowano HSV-1 (MOI 1) przez 8 godzin, przy braku lub w obecności INH-1 ODN (10 μ M), dodanego godzinę przed infekcją. Następnie z komórek izolowano RNA, poddawano odwrotnej transkrypcji i oznaczano względną ekspresję *IFNB1* z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym. Jako gen referencyjny zastosowano *HPRT1*. * $p < 0,001$

Uzyskane dane sugerują, że białko adaptorowe Mal jest zaangażowane w indukowaną przez TLR9 transdukcję sygnału w ludzkim mikrogleju i PBMC, zarówno w przypadku stymulacji komórek cząsteczkami wirusowymi, jak i syntetycznym ligandem dla TLR9.

6.3 BADANIE WPŁYWU MAL NA AKTYWACJĘ KASKAD SYGNAŁOWYCH TLR9 W KOMÓRKACH CHME-5 INFEKOWANYCH HSV-1

Celem zidentyfikowania białek aktywowanych przez HSV-1 na drodze zależnej od TLR9 i Mal wykonano, stosując technikę Western Blotting, analizę fosforylacji kinaz białkowych z rodziny MAP: ERK1/2 (p-ERK1/2) i p38 (p-p38). Aktywację badanych białek oceniano w odniesieniu do poziomu ich form natywnych (tot-ERK1/2, tot-p38) w ekstraktach komórkowych. Ponadto, zbadano poziom degradacji białka inhibitorowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B – I κ B α (Ryc. 6.3.1.).



Ryc. 6.3.1. Fosforylacja ERK1/2, p38 i degradacja I κ B α w komórkach CHME-5 infekowanych wirusem HSV-1. Komórki CHME-5 Ctrl i MalKD stymulowano HSV-1 (MOI 1) przez określony czas. Lizaty komórkowe poddawano SDS-PAGE i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzono z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni. Wizualizację przeprowadzono z użyciem aparatu Odyssey CLx Imaging System LI-COR.

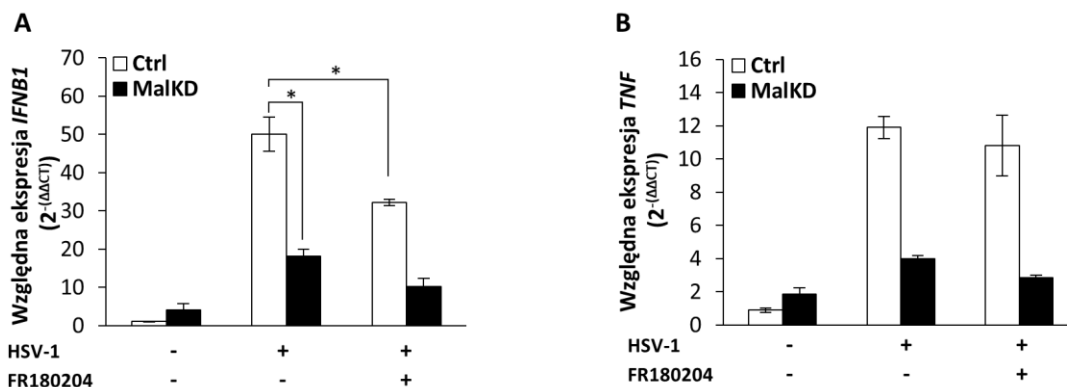
W komórkach kontrolnych (CHME-5 Ctrl) obserwowano późną aktywację kinaz ERK1/2, mającą miejsce godzinę po infekcji komórek, podczas gdy w komórkach z wyciszoną ekspresją genu dla Mal (MalKD) nie dochodziło do fosforylacji ERK1/2.

Nie zaobserwowano natomiast różnic w aktywacji kinazy p38. Kinaza ta była fosforylowana po około sześciu godzinach od infekcji komórek wirusem opryszczki, zarówno w komórkach kontrolnych, jak i z wyciszoną ekspresją genu kodującego Mal.

Z danych literaturowych wynika, że stymulacja TLR prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. W komórkach spoczynkowych NF- κ B jest utrzymywany w cytoplazmie w stanie nieaktywnym przez I κ B α . Dlatego postanowiono zbadać, czy I κ B α ulega

degradacji w komórkach CHME-5 infekowanych HSV-1. Nieoczekiwanie poziom ilości IκBα zarówno w komórkach Ctrl i MalKD stymulowanych HSV-1 pozostawał bez istotnej zmiany.

Następnie, w celu określenia efektu jaki fosforylacja ERK1/2 wywiera na zależną od TLR9 aktywację ekspresji cytokin, komórki CHME-5 traktowano HSV-1 w obecności specyficznego inhibitora tych kinaz - FR180204.



Ryc.6.3.2. Poziom ekspresji *IFNβ* i *TNF* w komórkach CHME-5 infekowanych HSV-1. Komórki stymulowano HSV-1 (MOI 1) przez 8 godzin, przy braku lub w obecności inhibitora ERK1/2 FR180204 (2,5 μM), dodanego 1 godzinę przed infekcją. Następnie z komórek izolowano RNA i metodą qPCR oznaczano poziom transkryptu dla IFNβ (A) i TNFα (B). Jako gen referencyjny zastosowano *HPRT1*.

W komórkach preinkubowanych z FR180204 dochodziło do słabego zahamowania produkcji interferonu w porównaniu z komórkami infekowanymi samym wirusem. Nie zaobserwowano natomiast zahamowania ekspresji genu kodującego TNFα (Ryc. 6.3.2.).

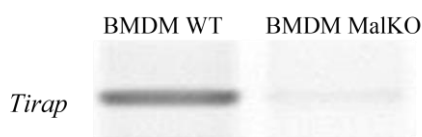
Wyniki te sugerują, że w komórkach CHME-5 zależna od TLR9 i Mal fosforylacja kinaz ERK1/2 prowadzi do aktywacji ramienia szlaku sygnałowego indukującego ekspresję interferonu beta.

6.4 WPŁYW NOKAUTU *TIRAP* NA TRANSDUKCJĘ SYGNAŁU ZALEŻNEGO OD TLR9 W MAKROFAGACH MYSICH

W kolejnych etapach pracy postanowiono szczegółowo zbadać mechanizm regulowania przez białko Mal transdukcji sygnału od TLR9. Do realizacji tego celu wykorzystano nieśmiertelne makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego myszy z nokautem genu kodującego Mal (BMDM MalKO) oraz komórki izolowane z myszy typu dzikiego, które stanowiły kontrolę (BMDM WT). Ponadto, do aktywacji receptora TLR9 wykorzystywano ligand syntetyczny, co minimalizowało możliwość wystąpienia efektów niespecyficznych.

6.4.1 Potwierdzenie specyficzności nokautu genu *Tirap* w komórkach BMDM

W pierwszym etapie, stosując technikę RT-PCR, zweryfikowano czy w komórkach BMDM MaIKO nie dochodzi do produkcji mRNA dla *Tirap*. Obecność transkryptu zaobserwowano jedynie w komórkach typu dzikiego (Ryc. 6.4.1.1.).



Ryc. 6.4.1.1. Badanie ekspresji *Tirap* w komórkach BMDM.

Z komórek BMDM WT i MaIKO izolowano RNA, które poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji. Następnie otrzymane cDNA amplifikowano w reakcji PCR. Produkt reakcji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym. Obrazowanie w zakresie promieniowania UV przeprowadzono w aparacie Typhoon Imager 8600.

Dodatkowo w komórkach BMDM sprawdzono poziom ekspresji mRNA dla receptora TLR9 oraz białka adaptorowego MyD88 i pokazano, że nokaut *Tirap* nie zaburza produkcji transkryptu dla tych genów (Tab. 6.4.1.1.).

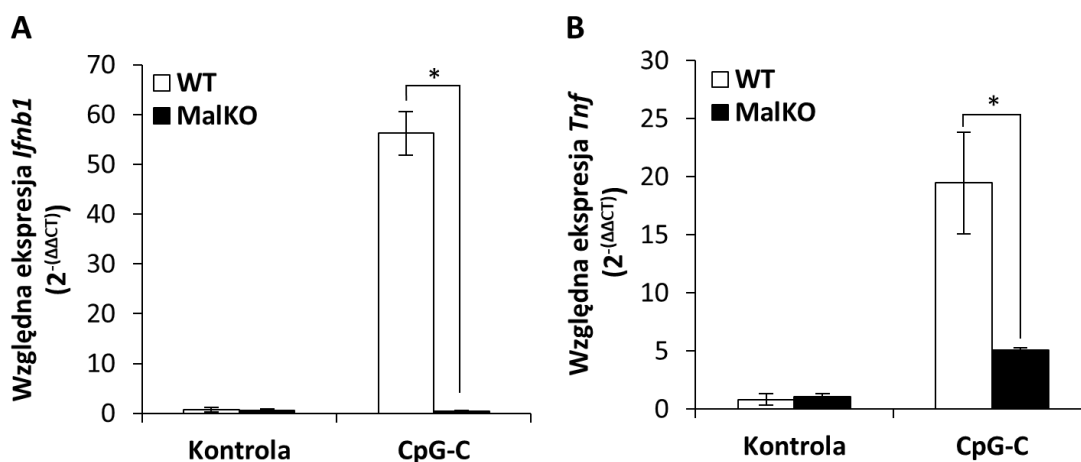
Tab. 6.4.1.1. Poziom ekspresji *Myd88* i *Tlr9*.

	$\Delta C(T) [C(T)_{GEN}-C(T)_{HPRT}]$	
	BMDM WT	BMDM MaIKO
<i>Myd88</i>	4,94 ± 0,03	5,09 ± 0,14
<i>Tlr9</i>	4,95 ± 1,19	5,17 ± 0,52

Z komórek BMDM WT i MaIKO izolowano RNA, które poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji. Otrzymane cDNA stanowiło matrycę do oznaczenia ekspresji genów *Myd88* oraz *Tlr9* w reakcji qPCR. Jako gen referencyjny zastosowano *Hprt1*.

6.4.2 Aktywacja produkcji IFN β i TNF α w odpowiedzi na stymulację komórek BMDM CpG-C

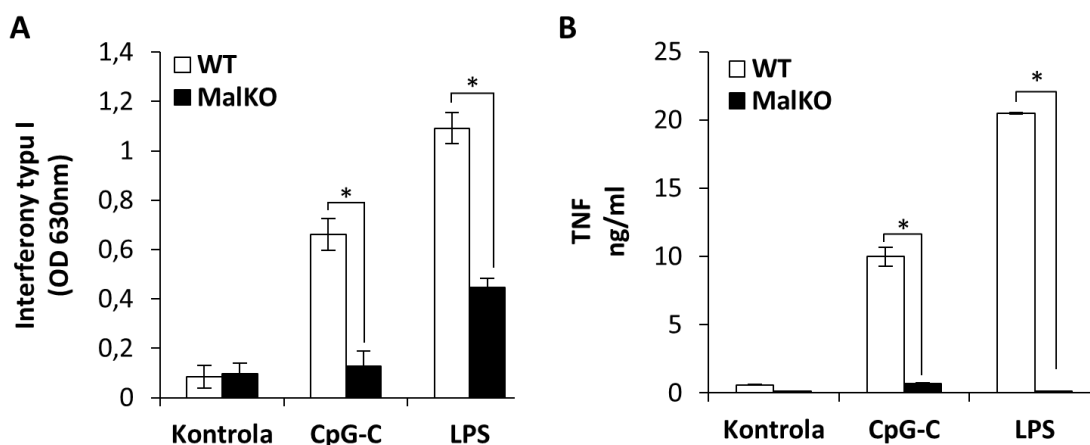
Stosując metodę PCR w czasie rzeczywistym pokazano, że w komórkach BMDM MaIKO stymulowanych agonistą TLR9 poziom transkryptu dla *Ifnb1*, a także dla *Tnf* był znacznie obniżony w stosunku do komórek typu dzikiego (Ryc. 6.4.2.1.).



Ryc. 6.4.2.1. Poziom ekspresji *Ifnb1* i *Tnf* w komórkach BMDM stymulowanych ligandem dla TLR9. Komórki BMDM WT i MalKO stymulowano CpG-C (5 μ M) przez 4 godziny. Następnie izolowano RNA, poddawano odwrotnej transkrypcji i oznaczano względną poziom ekspresji *Ifnb1* (A) i *Tnf* (B). Ekspresję genów badano z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym, a względną poziom transkryptu oznaczano wg metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Jako gen referencyjny zastosowano *Hprt1*. * $p < 0,001$

W kolejnym etapie sprawdzono czy dane uzyskane na poziomie transkryptu korelują z pomiarami ilości lub aktywności odpowiadających im białek. Do pomiaru biologicznie aktywnych interferonów zastosowano Bioassay wykorzystujący komórki B16 BlueTM produkujące fosfatazę alkaliczną w odpowiedzi na stymulację interferonami typu I i II, natomiast syntezę TNF α oceniano wykorzystując test ELISA.

Zaobserwowano, że zarówno synteza biologicznie aktywnych interferonów, jak i produkcja TNF α przez komórki stymulowane agonistą TLR9, są znacznie zahamowane w komórkach MalKO. Kontrolę pozytywną eksperymentu stanowiły komórki stymulowane LPS, będącym aktywatorem receptora TLR4 (Ryc. 6.4.2.2.).



Ryc. 6.4.2.2. Pomiar poziomu interferonów typu I i TNF α w komórkach BMDM stymulowanych ligandem dla TLR9. Komórki BMDM WT i MalKO stymulowano CpG-C (5 μ M) przez 24 godziny. Następnie w medium znad komórek oznaczano poziom interferonów typu I (A) wykorzystując test biologiczny (Bioassay) oraz TNF α (B) korzystając z metody ELISA. * $p < 0,001$

6.5 BADANIE WPŁYWU MAL NA AKTYWACJĘ KASKAD SYGNAŁOWYCH RECEPTORA TLR9 AKTYWOWANEGO CpG-C ODN W KOMÓRKACH BMDM

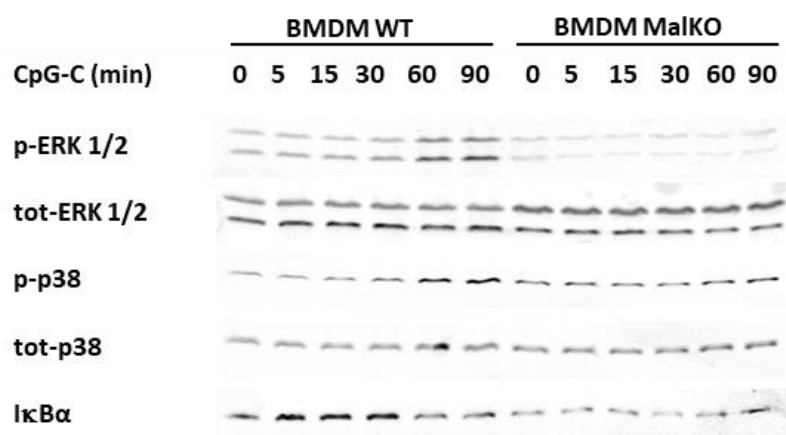
Z uwagi na fakt, że w eksperymentach, w których modelem badawczym były komórki ludzkie rolę agonisty receptora TLR9 pełnił HSV-1, postanowiono sprawdzić czy efekty uzyskane na modelu mysim z wykorzystaniem syntetycznego, wysoce specyficznego liganda CpG-C ODN będą takie same.

W tym celu komórki BMDM WT i MalKO traktowano CpG-C ODN przez wskazany czas, a następnie, wykorzystując technikę Western Blotting, badano aktywację kinaz ERK1/2 i p38, stosując przeciwciała skierowane przeciwko fosforylowanym formom tych kinaz (p-ERK1/2, p-p38), a także oznaczano degradację inhibitora I κ B α czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (Ryc. 6.5.1.).

Zaobserwowano, że w komórkach BMDM typu dzikiego dochodzi do późnej aktywacji kinaz białkowych ERK1/2 (po 60 minutach stymulacji), której nie wykryto w komórkach BMDM z nokautem genu kodującego białko Mal.

Fosforylacja kinazy p38 również zachodziła 60 minut po stymulacji komórek, przy czym nie zauważono różnic w jej aktywacji pomiędzy komórkami WT i MalKO.

Ponadto, podobnie jak w przypadku komórek CHME-5 infekowanych HSV-1, nie obserwowano degradacji I κ B α , co może sugerować, że indukcja IFN β i TNF α przez TLR9 nie wymaga kanonicznego mechanizmu aktywacji NF- κ B.

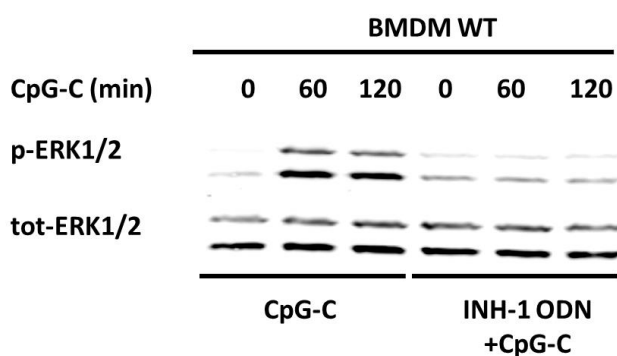


Ryc. 6.5.1. Analiza fosforylacji ERK1/2, p38 i degradacji I κ B α w komórkach BMDM WT i MalKO traktowanych ligandem dla TLR9. Komórki BMDM WT i MalKO stymulowano CpG-C (5 μ M) przez określony czas. Lizaty komórkowe poddawano SDS-PAGE i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzano z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni. Wizualizację przeprowadzano z użyciem aparatu Odyssey CLx Imaging System LI-COR.

6.5.1 Kontrola swoistości aktywacji ERK1/2 przez TLR9

W celu sprawdzenia czy aktywacja ERK1/2 po stymulacji CpG-C wynikała ze specyficznego oddziaływania ligand-receptor i nie była spowodowana sygnałem stresowym, zastosowano oligonukleotyd inhibitorowy, INH-1-ODN, do zablokowania TLR9.

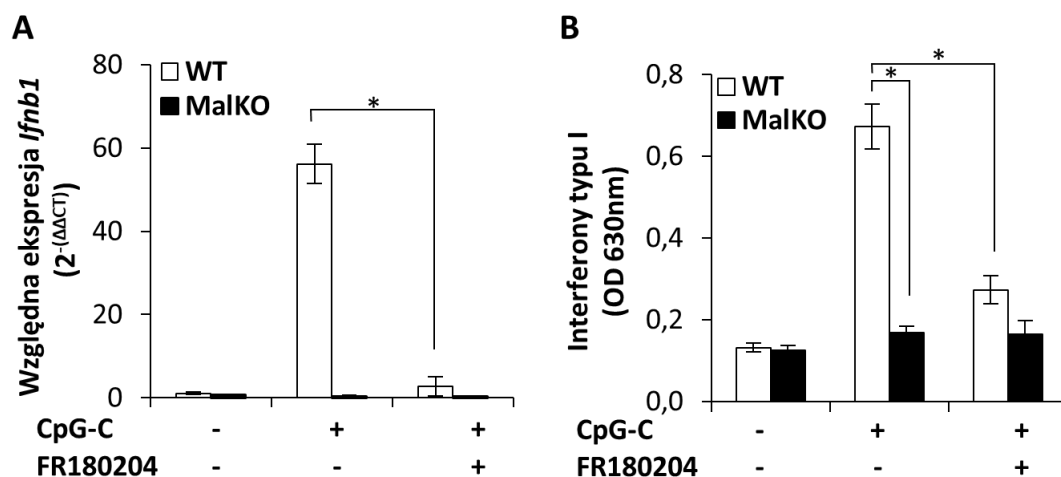
W komórkach BMDM wstępnie traktowanych INH-1 ODN zaobserwowano silne zahamowanie fosforylacji ERK1/2 (p-ERK 1/2) w porównaniu do komórek stymulowanych jedynie agonistą TLR9, co wskazuje, że CpG-C aktywuje ERK1/2 na drodze zależnej od TLR9 bez wywoływania stresu komórkowego (Ryc. 6.5.1.1.). W celu kontroli eksperymentu analizowano poziom natywnego białka ERK1/2 (tot-ERK1/2).



Ryc. 6.5.1.1. Kontrola specyficzności fosforylacji ERK1/2 w komórkach BMDM WT i MalKO traktowanych ligandem dla TLR9. Komórki BMDM WT i MalKO stymulowano CpG-C (5 μ M) przez określony czas przy braku lub w obecności inhibitora receptora TLR9 (INH-1 ODN, 10 μ M), dodanego na godzinę przed stymulacją. Lizaty komórkowe poddawano SDS-PAGE i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję białek przeprowadzano z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni. Wizualizację przeprowadzano z użyciem aparatu Odyssey CLx Imaging System LI-COR.

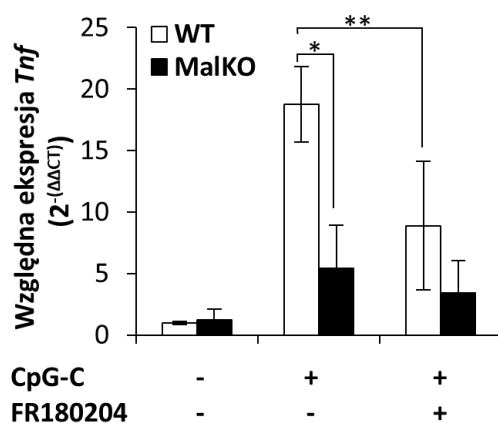
6.5.2 Wpływ zależnej od TLR9 i Mal fosforylacji ERK1/2 na ekspresję *Ifnb1* i *Tnf* w komórkach BMDM

Z uwagi na brak fosforylacji kinaz ERK1/2 w BMDM MalKO postanowiono zbadać ekspresję *Ifnb1* i *Tnf* w komórkach stymulowanych CpG-C w obecności lub przy braku specyficznego inhibitora tych kinaz – FR180204.



Ryc. 6.5.2.1. Poziom ekspresji *Ifnb1* i biologicznie aktywnych IFN I w komórkach BMDM WT i MalKO. Komórki stymulowano CpG-C (5 μ M) przez 4 (A) lub 16 godzin (B), przy braku lub w obecności inhibitora ERK1/2 FR180204 (2,5 μ M), dodanego 1 godzinę przed stymulacją ligandem. Następnie z komórek izolowano RNA i metodą qPCR oznaczano poziom transkryptu dla IFN β (A) lub oznaczano poziom IFN I metodą biologiczną w medium znad komórek (B). * $p < 0,001$

Jak pokazano na Ryc. 6.5.2.1. w komórkach typu dzikiego traktowanych FR180204 i CpG-C doszło do zniesienia syntezy mRNA dla *Ifnb1*, co ma swoje odzwierciedlenie w produkcji biologicznie aktywnego interferonu. Zaobserwowano również obniżenie poziomu wytwarzania mRNA dla TNF α w komórkach pretraktowanych inhibitorem kinaz ERK1/2 (Ryc. 6.5.2.2.).

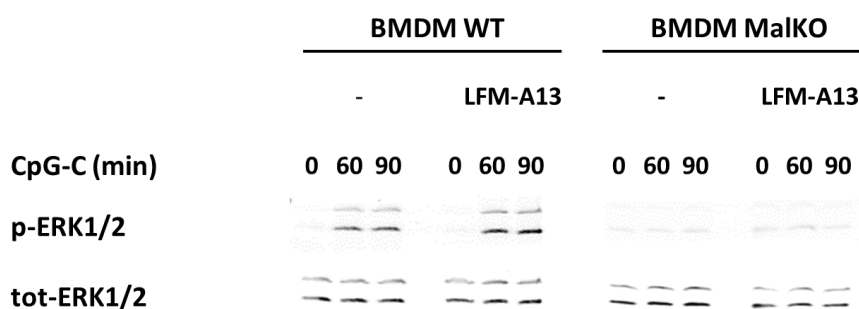


Ryc. 6.5.2.2. Poziom ekspresji *Tnf* w komórkach BMDM WT i MalKO. Komórki stymulowano CpG-C (5 μ M) przez 4 godziny, przy braku lub w obecności inhibitora ERK1/2 FR180204 (2,5 μ M), dodanego 1 godzinę przed stymulacją ligandem. Następnie z komórek izolowano RNA i metodą qPCR oznaczano poziom transkryptu dla TNF α . Jako gen referencyjny zastosowano *Hprt1*. * $p < 0,001$, ** $p < 0,05$

Podsumowując, obserwacje te sugerują, że brak białka adaptorowego Mal hamuje aktywację ERK1/2 zależną od TLR9, co w konsekwencji prowadzi do upośledzenia ekspresji *Ifnb1* i *Tnf* w komórkach BMDM.

6.6 BADANIE UDZIAŁU KINAZY BTK W ZALEŻNEJ OD MAL REGULACJI AKTYWNOŚCI KINAZ BIAŁKOWYCH ERK1/2

Z danych literaturowych wynika, że po aktywacji receptorów z rodziny Toll-podobnych (TLR2 i TLR4) białko adaptorowe Mal podlega fosforylacji przez kinazę BTK w domenie TIR, co umożliwia przekazanie sygnału na dalsze białka kaskady (120). Postanowiono zatem zbadać wpływ tej kinazy na aktywację ERK1/2 indukowaną przez receptor TLR9. W tym celu komórki BMDM typu dzikiego i z nokautem genu dla Mal traktowano inhibitorem kinazy BTK LFM-A13, a następnie stymulowano agonistą TLR9 – CpG-C ODN. Po upływie określonego czasu stymulacji oceniano fosforylację kinaz ERK1/2 z wykorzystaniem techniki Western Blotting. Jak przedstawiono na Ryc. 6.6.1. kinazy ERK1/2 ulegały fosforylacji zarówno w obecności, jak i przy braku inhibitora LFM-A13. Uzyskany wynik wskazuje, że w komórkach BMDM kinaza BTK nie jest zaangażowana w aktywację kinaz ERK1/2 na drodze zależnej od TLR9.

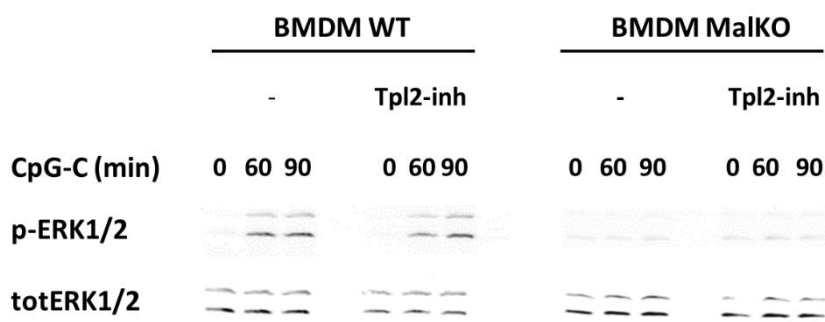


Ryc. 6.6.1. Fosforylacja ERK1/2 w komórkach BMDM WT i MalKO traktowanych ligandem dla TLR9. Komórki BMDM WT i MalKO traktowano LFM-A13 (10 μ M), a następnie stymulowano CpG-C (5 μ M) przez określony czas. Lizaty komórkowe poddawano SDS-PAGE i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję poszczególnych białek przeprowadzano z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni. Wizualizację przeprowadzano z użyciem aparatu Odyssey CLx Imaging System LI-COR.

6.7 ANALIZA WPLYWU KINAZY TPL2 NA PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU OD TLR9

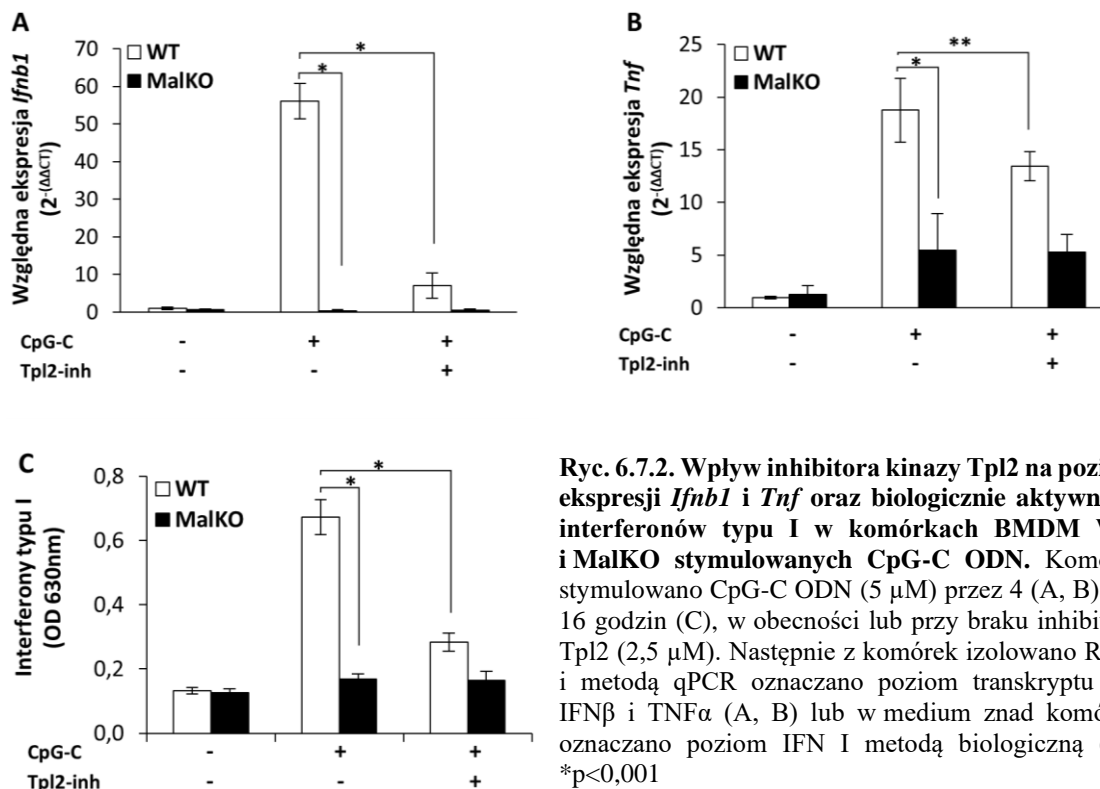
Jak wspomniano we Wstępie w komórkach niestymulowanych kinaza Tpl2 może tworzyć kompleks z prekursorem podjednostki p50 czynnika transkrypcyjnego NF- κ B – p105, który hamuje aktywację tej kinazy. Po degradacji p105 Tpl2 może fosforylować MEK1/2 dla, których ERK1/2 są substratami. Dlatego też, w kolejnym etapie pracy postanowiono sprawdzić wpływ kinazy Tpl2 na zależną od TLR9 aktywację kinaz ERK1/2 oraz indukcję ekspresji cytokin w komórkach BMDM.

Komórki BMDM WT i MalKO traktowano inhibitorem kinazy Tpl2, a następnie stymulowano ligandem dla TLR9. Po określonym czasie stymulacji oznaczano poziom fosforylacji ERK1/2 w obu populacjach komórek (Ryc. 6.7.1.).



Ryc. 6.7.1. Analiza zależnej od TLR9 fosforylacji kinaz ERK1/2 w odpowiedzi na zahamowanie aktywności kinazy Tpl2. Komórki BMDM WT i MalKO traktowano Tpl2-inh (2,5 μ M), a następnie stymulowano CpG-C (5 μ M) przez określony czas. Lizaty komórkowe poddawano SDS-PAGE i przenoszono na nitrocelulozę. Detekcję białek przeprowadzono z użyciem skierowanych przeciwko nim przeciwciał oraz odpowiednich przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni. Wizualizację przeprowadzono z użyciem aparatu Odyssey CLx Imaging System LI-COR.

Jak pokazano na Ryc. 6.7.1. zahamowanie kinazy Tpl2 nie wpłynęło na poziom fosforylacji kinaz ERK1/2, które w komórkach typu dzikiego aktywowane były po 60 minutach stymulacji ligandem dla TLR9. Mimo braku oczekiwanych różnic postanowiono zbadać wpływ inhibitora kinazy Tpl2 na ekspresję genów *Ifnb1* i *Tnf* oraz poziom biologicznie aktywnych interferonów typu I w komórkach BMDM traktowanych CpG-C ODN (Ryc. 6.7.2.).

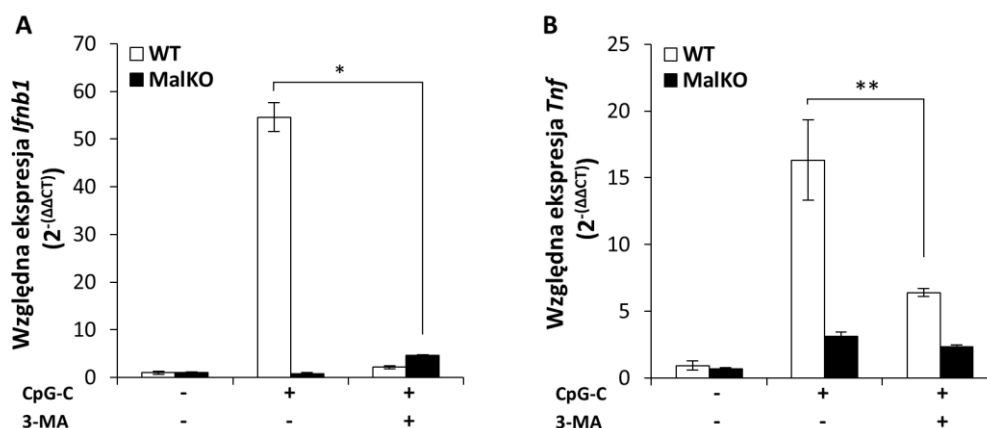


Zauważono, że zastosowanie inhibitora kinazy Tpl2 silnie hamowało syntezę mRNA dla *Ifnb1*, jak i produkcję biologicznie aktywnych interferonów typu I. Natomiast wpływ Tpl2-inh na ekspresję *Tnf* nie był już tak znaczący. W tym przypadku zaobserwowano zahamowanie syntezy transkryptu o około 30%.

6.8 BADANIE ROLI BIAŁKA MAL W PROCESIE AUTOFAGII

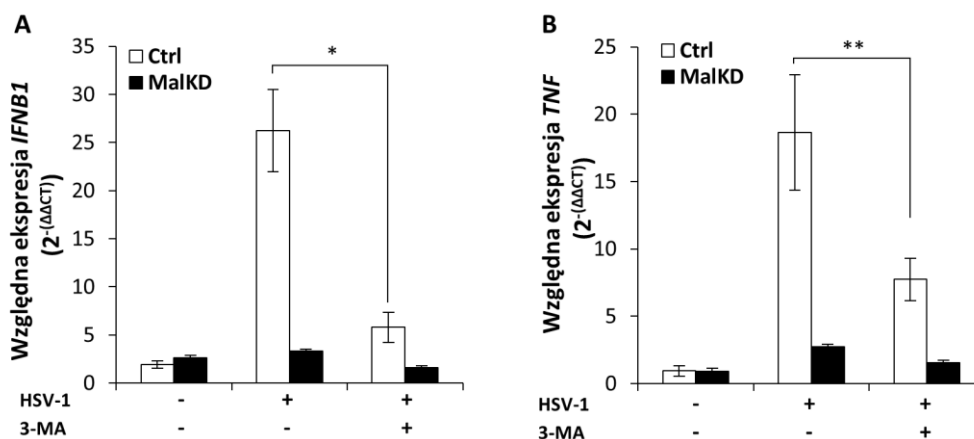
6.8.1 Udział PI3K w aktywowanej przez TLR9 ekspresji *IFNB1* oraz *TNF*

Zgodnie z piśmiennictwem receptory TLR zaangażowane są w proces autofagii, pozwalający na usunięcie bakterii lub wirusów z wnętrza komórki (178). W celu zbadania potencjalnej roli białka Mal w modulowaniu tego procesu postanowiono sprawdzić, czy zastosowanie inhibitora kinazy PI3K, 3-MA (179), wpłynie na aktywację ekspresji cytokin indukowaną CpG-C w komórkach BMDM. Zaobserwowano, że inhibitor znosi zależną od TLR9 ekspresję mRNA dla IFNβ w komórkach typu dzikiego, natomiast ekspresja *Tnf* zostaje zredukowana o około 60%. (Ryc. 6.8.1.1.)



Ryc. 6.8.1.1. Poziom ekspresji *Ifnb1* oraz *Tnf* w komórkach BMDM WT i MalKO. Komórki stymulowano CpG-C (5 μ M) przez 4 godziny, przy braku lub w obecności 3-MA (5 μ M), dodanego 1 godzinę przed stymulacją ligandem. Następnie z komórek izolowano RNA i metodą qPCR oznaczano ekspresję *Ifnb1* (A) i *Tnf* (B). Jako gen referencyjny zastosowano *Hprt1*. * $p < 0,001$, ** $p < 0,05$

Następnie podobne badania przeprowadzono z wykorzystaniem komórek CHME-5 infekowanych wirusem HSV-1 w obecności lub przy braku inhibitora 3-MA.



Ryc. 6.8.1.2. Poziom ekspresji *IFNB1* i *TNF* w komórkach CHME-5 infekowanych HSV-1. Komórki stymulowano HSV-1 (MOI 1) przez 8 godzin, przy braku lub w obecności inhibitora PI3K 3-MA (5 μ M), dodanego 1 godzinę przed infekcją. Następnie z komórek izolowano RNA i metodą qPCR oznaczano poziom transkryptu dla *IFN β* (A) i *TNF α* (B). Jako gen referencyjny zastosowano *HPRT1*. * $p < 0,001$, ** $p < 0,05$

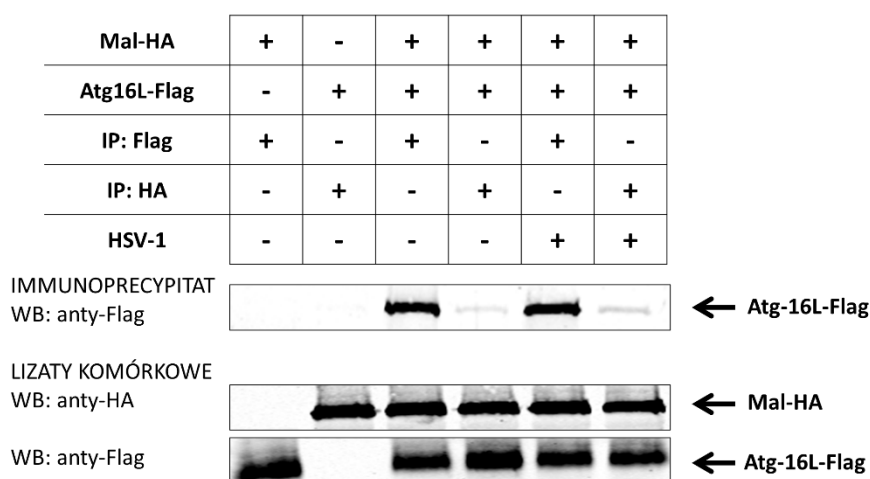
Zaobserwowano, że podobnie jak w przypadku komórek BMDM, ekspresja *IFNB1* ulegała istotnemu zahamowaniu w komórkach traktowanych inhibitorem 3-MA przed stymulacją wirusem HSV-1, natomiast poziom transkryptu dla *TNF α* został zredukowany o ponad połowę (Ryc. 6.8.1.2.).

Dane te sugerują, że kinaza PI3 uczestniczy w aktywacji ekspresji genów kodujących cytokiny na drodze zależnej od TLR9. Biorąc pod uwagę udział PI3-K w indukcji autofagii można przypuszczać, że istnieje powiązanie między tym procesem, a szlakiem sygnałowym receptora Toll-podobnego 9.

6.8.2 Oddziaływanie białka adaptorowego Mal z białkiem Atg16L1

W kolejnym etapie badań, stosując koimmunoprecypitację, sprawdzono potencjalną zdolność białka Mal do oddziaływania z białkiem Atg16L1, które bierze udział w tworzeniu autofagosomów. W tym celu komórki HEK-TLR9 kotransfekowano wektorami kodującymi badane białka i stymulowano wirusem HSV-1. Następnie z lizatów komórkowych wyodrębniano Mal lub Atg16L1 stosując przeciwciała specyficzne względem prezentowanych przez badane białka metek (HA lub Flag).

Zaobserwowano, że białko Atg16L1 jest immunoprecypitowane wspólnie z białkiem Mal, a dodatkowo jego ilość wzrasta w lizatach uzyskanych z komórek stymulowanych HSV-1. Wynik ten sugeruje, że białko adaptorowe Mal może wiązać się bezpośrednio do białka Atg16L1. Interakcja białek Mal i Atg16L1 może mieć znaczenie podczas tworzenia się fagoforu lub fuzji autofagosomu z endosomem (Ryc. 6.8.2.1.).



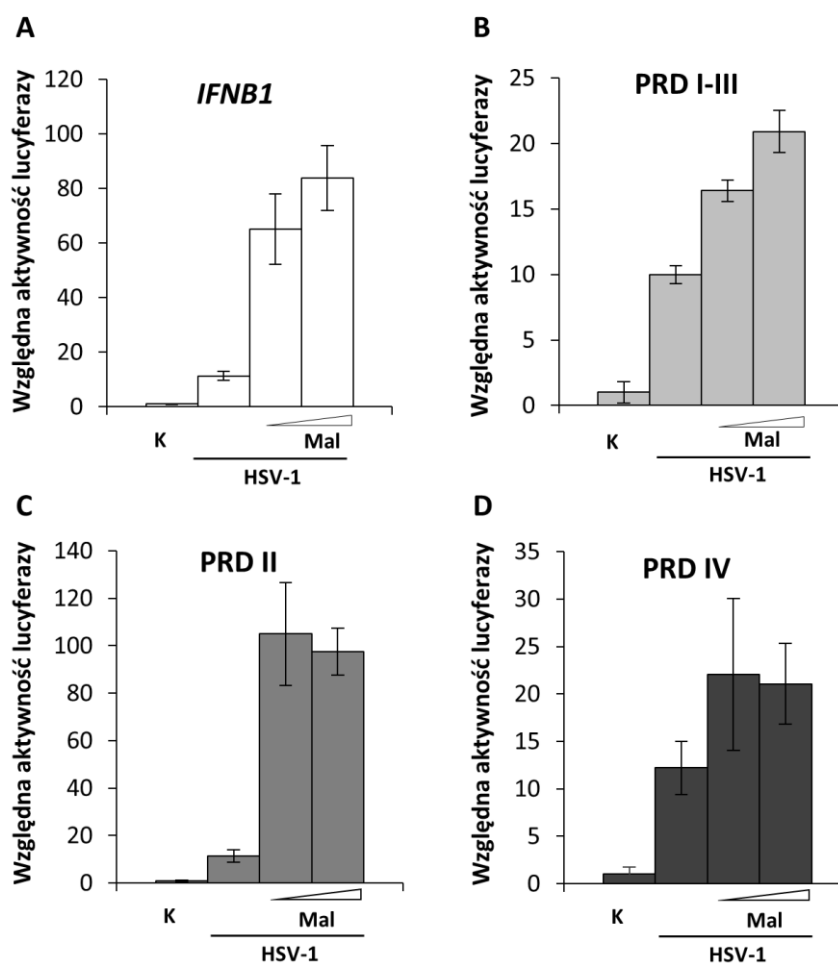
Ryc. 6.8.2.1. Koimmunoprecypitacja białek Mal i Atg16L1. Komórki HEK-TLR9 kotransfekowano konstrukcjami zawierającymi gen kodujący białko Mal z metką HA lub białko Atg16L1 z metką Flag. Po 24 godzinach hodowli komórki stymulowano HSV-1 (MOI 1; 2 godziny). Następnie komórki poddawano lizie i przeprowadzono immunoprecypitację białek z użyciem przeciwciał anti-HA lub anti-Flag. W celu wykrycia badanych białek zarówno immunoprecypitaty, jak i lizaty komórkowe analizowano techniką Western Blotting.

6.9 BADANIE UDZIAŁU BIAŁKA MAL W AKTYWACJI CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH INDUKOWANYCH PRZEZ TLR9

6.9.1 Analiza reporterowa aktywacji regionu promotorowego genu *IFNB1*

Otrzymane dane sugerują, że białko adaptorowe Mal jest niezbędne do aktywacji ekspresji interferonu β na drodze zależnej od TLR9. W kolejnych etapach pracy postanowiono

zidentyfikować czynniki transkrypcyjne warunkujące inicjację ekspresji genu *IFNB1* regulowane przez Mal. W tym celu wykonano analizę reporterową z użyciem komórek HEK293 ze stabilną ekspresją TLR9 (HEK-TLR9), przejściowo transfekowanych wektorami reporterowymi zawierającymi sekwencję pełnego promotora dla *IFNB1* lub jego poszczególnych domen regulatorowych: PRD I-III, PRD II, PRD IV. Komórki dodatkowo transfekowano wektorem ekspresyjnym kodującym gen dla Mal i infekowano HSV-1.

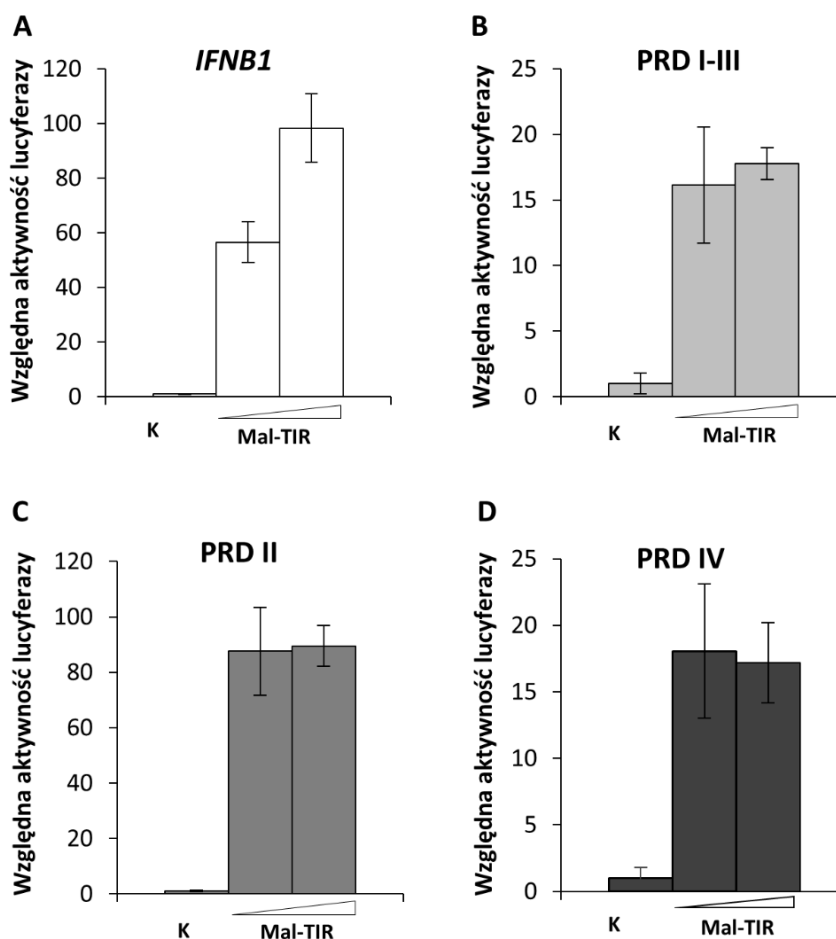


Ryc. 6.9.1.1. Analiza reporterowa aktywacji promotora genu dla *IFN β* w komórkach HEK-TLR9 infekowanych HSV-1. Komórki HEK-TLR9 kotransfekowano plazmidami reporterowymi zawierającymi gen lucyferazy świetlika pod kontrolą promotora genu *IFNB1* lub jego poszczególnych domen: PRD I-III, PRD II, PRD IV (80 ng) oraz wektorem ekspresyjnym kodującym *TIRAP* (10 ng lub 20 ng). Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane wektorem z sekwencją dla Mal. Po 16 godzinach hodowli komórki traktowano HSV-1 (MOI 1) przez 8 godzin i poddawano lizie. Do lizatów dodawano substrat dla lucyferaz i mierzono poziom luminescencji.

Zaobserwowano, że w komórkach traktowanych HSV-1 dochodziło do aktywacji promotora *IFNB1*, którą wzmagala ekspresja genu dla Mal. Każda z domen PRD również ulegała aktywacji zależnej od TLR9 i była regulowana przez Mal, jednakże najbardziej aktywną okazała

się domena PRDII, która jest odpowiedzialna za wiązanie czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (Ryc. 6.9.1.1).

Następnie przeprowadzono kolejną analizę reporterową, w której komórki HEK-TLR9 transfekowano wektorem ekspresyjnym z wklonowaną sekwencją kodującą domenę TIR białka Mal oraz, tak jak poprzednio, plazmidami reporterowymi z sekwencją pełnego promotora genu dla IFN β lub poszczególnych domen regulatorowych PRD.



Ryc. 6.9.1.2. Analiza reporterowa aktywacji promotora genu dla IFN β przez domenę TIR białka Mal w komórkach HEK-TLR9. Komórki HEK-TLR9 kotransfekowano plazmidami reporterowymi zawierającymi gen lucyferazy świetlika pod kontrolą promotora genu *IFNB1* lub jego poszczególnych domen: PRD I-III, PRD II, PRD IV (80 ng) oraz wektorem ekspresyjnym z sekwencją kodującą domenę TIR białka Mal (10 ng lub 20 ng). Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane wektorem Mal-TIR. Po 24 godzinach hodowli komórki poddawano licze. Do lizatów dodawano substrat dla lucyferaz i mierzono poziom luminescencji.

Jak pokazano na Rycinie 6.9.1.2. nadekspresja plazmidu kodującego Mal-TIR powodowała aktywację zarówno promotora genu dla interferonu β , jak i jego domen regulatorowych, spośród których najsilniej aktywowana była PRDII wiążąca czynnik NF- κ B.

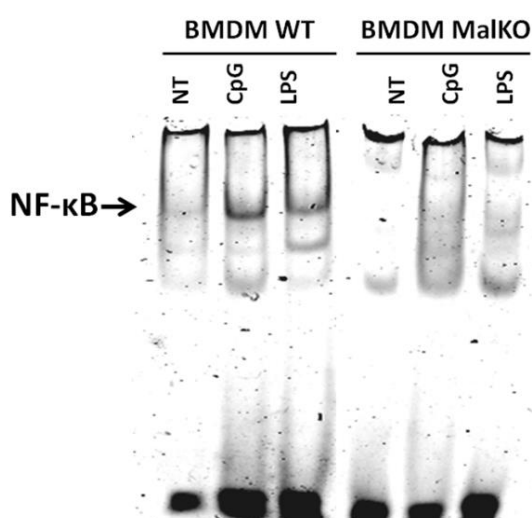
Tym samym dane uzyskane z wykorzystaniem analizy reporterowej sugerują, że domena PRDII odgrywa kluczową rolę w indukcji ekspresji *IFNBI* w komórkach wykazujących jednoczesną nadekspresję *TLR9* i *TIRAP*.

6.10 BADANIE UDZIAŁU BIAŁKA MAL W REGULACJI AKTYWNOŚCI CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH W MAKROFAGACH MYSICH

6.10.1 Badanie translokacji jądrowej czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i jej wpływu na indukcję cytokin

Jak zaobserwowano wcześniej, w komórkach BMDM MalKO stymulowanych CpG-C ODN nie dochodziło do degradacji podjednostki inhibitora czynnika transkrypcyjnego NF- κ B – I κ B α . Jednakże, zarówno dane literaturowe, jak i omówiona powyżej analiza reporterowa wskazują, że podczas aktywacji receptora TLR9 czynnik ten translokowany jest do jądra komórkowego, co prowadzi do indukcji ekspresji zależnych od niego cytokin. Z tego względu postanowiono sprawdzić, czy czynnik transkrypcyjny NF- κ B jest aktywowany przez receptor TLR9 w komórkach BMDM.

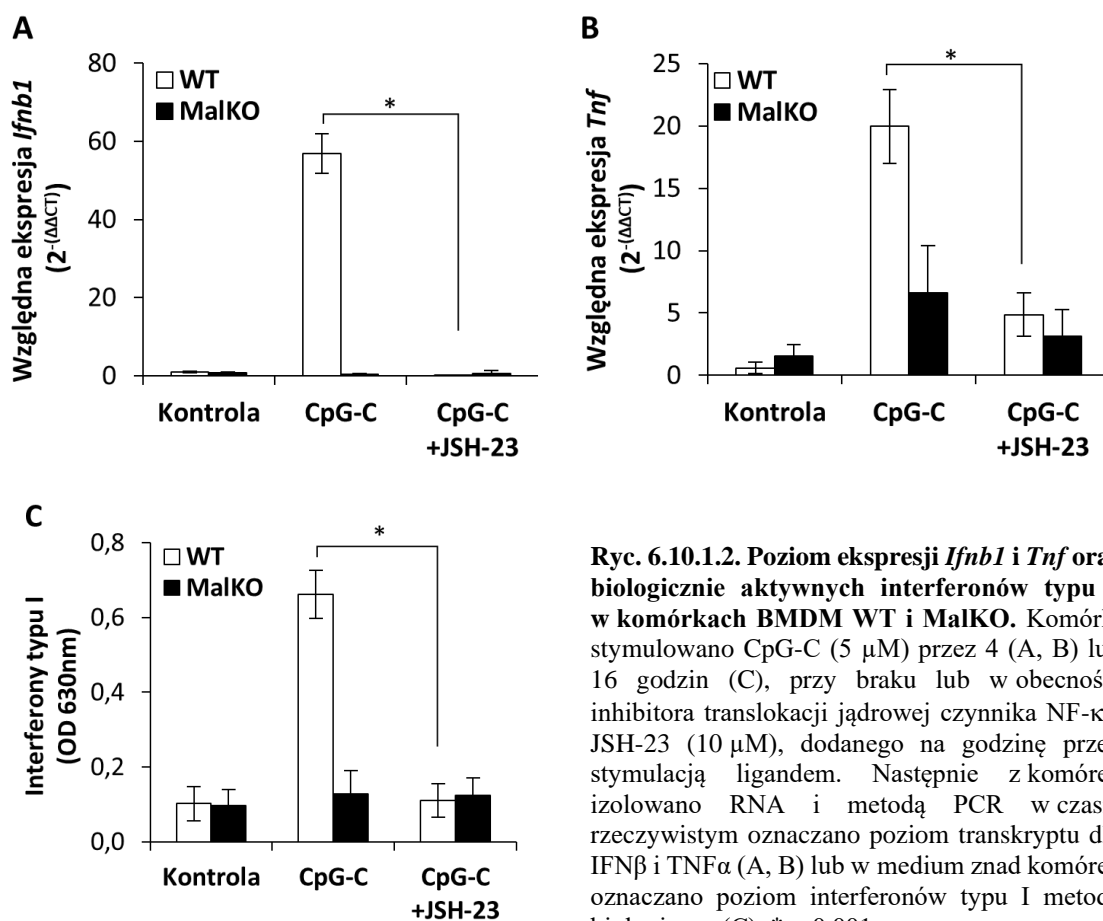
Wykorzystując test zmiany ruchliwości elektroforetycznej (EMSA) pokazano, że w BMDM typu dzikiego dochodzi do translokacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B do jądra komórkowego, czego nie obserwowano w komórkach z nokautem genu kodującego Mal. Dla kontroli komórki stymulowano lipopolisacharydem bakteryjnym (LPS). Również w tym przypadku NF- κ B aktywowany był jedynie w komórkach typu dzikiego, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Ryc. 6.10.1.1.).



Ryc. 6.10.1.1. Badanie translokacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach BMDM traktowanych ligandem dla TLR9. Komórki BMDM WT i MalKO stymulowano CpG-C (5 μ M) przez 120 minut. Po tym czasie z komórek izolowano frakcje jądrowe, a następnie, w celu związania czynnika NF- κ B, przeprowadzano inkubację ze specyficznymi, znakowanymi fluorescencyjnie sondami oligonukleotydowymi. Próbki poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym. Wizualizację przeprowadzano z użyciem aparatu Odyssey CLx Imaging System LI-COR.

W związku z powyższym w kolejnym etapie postanowiono sprawdzić, czy zahamowanie translokacji NF- κ B wpływa na ekspresję genów dla cytokin aktywowaną ligandem dla TLR9. W tym celu zastosowano farmakologiczny inhibitor translokacji jądrowej czynnika NF- κ B – JSH-23.

Jak pokazano na Ryc. 6.10.1.2. preinkubacja komórek z JSH-23 powodowała zahamowanie produkcji cytokin (IFN β i TNF α) przez komórki BMDM w odpowiedzi na ligand CpG-C ODN.

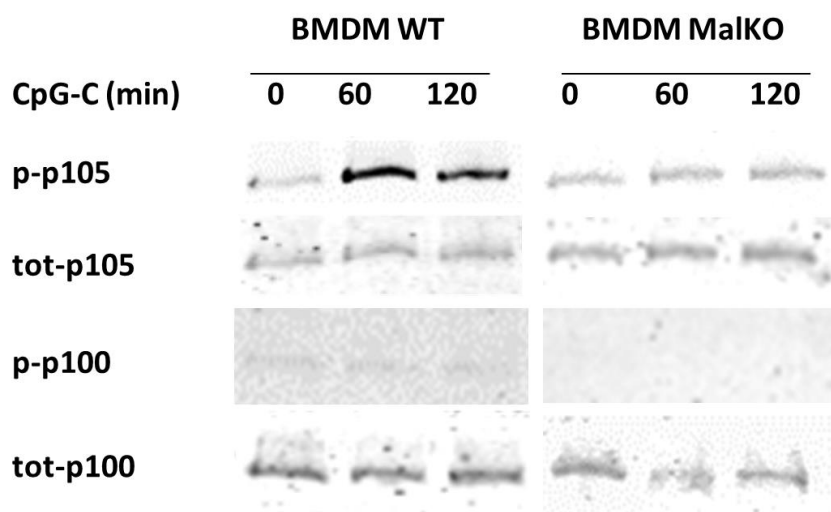


Ryc. 6.10.1.2. Poziom ekspresji *Ifnb1* i *Tnf* oraz biologicznie aktywnych interferonów typu I w komórkach BMDM WT i MalKO. Komórki stymulowano CpG-C (5 μ M) przez 4 (A, B) lub 16 godzin (C), przy braku lub w obecności inhibitora translokacji jądrowej czynnika NF- κ B JSH-23 (10 μ M), dodanego na godzinę przed stymulacją ligandem. Następnie z komórek izolowano RNA i metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczano poziom transkryptu dla IFN β i TNF α (A, B) lub w medium z komórek oznaczano poziom interferonów typu I metodą biologiczną (C). * $p < 0,001$

6.10.2 Analiza wpływu białka Mal na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B

Powyższe obserwacje spowodowały, że postanowiono głębiej przeanalizować aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Wiadomym jest, że aktywny NF- κ B występuje w jądrze komórkowym w postaci dimeru (homodimeru lub heterodimeru) zbudowanego z białek należących do rodziny Rel/NF- κ B: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), c-Rel, RelA (p65) oraz RelB. Dwa pierwsze z tych białek obecne są w cytoplazmie w formie nieaktywnych prekursorów, odpowiednio p105 i p100.

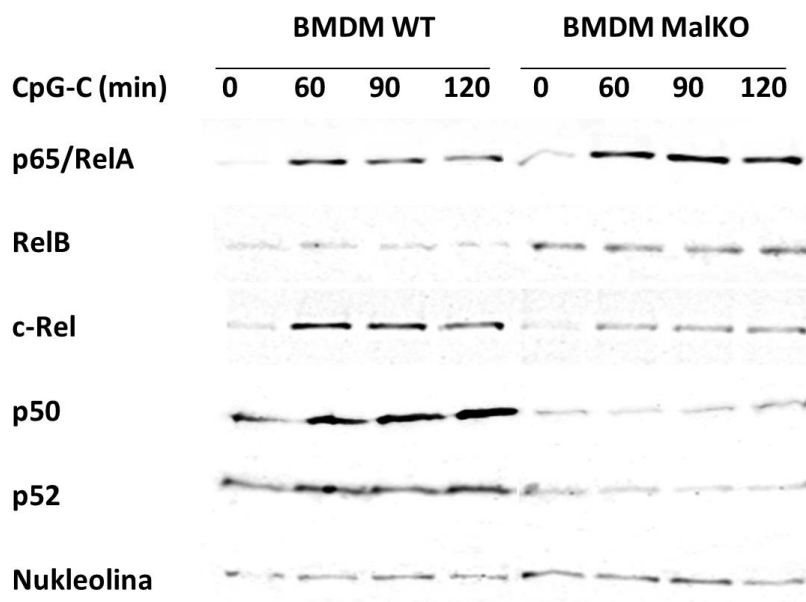
Powstanie form aktywnych poprzedzone jest fosforylacją prekursora, a następnie jego proteolityczną obróbką przez podjednostkę 26S proteasomu. Z tego względu, aby wyjaśnić zależną od Mal aktywację NF- κ B postanowiono zbadać fosforylację białek p105 i p100.



Ryc. 6.10.2.1. Fosforylacja prekursorów podjednostek czynnika NF- κ B w komórkach BMDM stymulowanych CpG-C ODN. Komórki WT i MalKO stymulowano CpG-C ODN (5 μ M) przez określony czas. Następnie lizaty komórkowe poddawano SDS-PAGE. Detekcję białek przeprowadzono z użyciem specyficznych przeciwciał i skierowanych przeciwko nim przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni. Wizualizację przeprowadzono z użyciem aparatu Odyssey CLx Imaging System LI-COR.

W komórkach typu dzikiego stymulowanych CpG-C ODN, w przeciwieństwie do komórek z nokautem genu kodującego białko Mal, zaobserwowano występowanie ufosforylowanej formy p105. Natomiast białko p100 nie ulegało fosforylacji ani w BMDM WT, ani w BMDM MalKO. Poziom białek ufosforylowanych analizowano w odniesieniu do białka całkowitego (tot-p100 i tot-p105) (Ryc. 6.10.2.1.).

Powstanie aktywnej formy NF- κ B prowadzi do jego translokacji do jądra komórkowego. W związku z tym w kolejnym kroku postanowiono zbadać obecność konkretnych podjednostek tego czynnika transkrypcyjnego we frakcjach jądrowych komórek stymulowanych CpG-C ODN. Kontrolę poziomu białka stanowiła nukleolina.



Ryc. 6.10.2.2. Analiza translokacji podjednostek czynnika NF- κ B do jądra komórkowego. Komórki stymulowano CpG-C ODN (5 μ M) przez wskazany czas, a następnie izolowano z nich frakcje jądrowe, które poddawano SDS-PAGE. Detekcję białek przeprowadzono z użyciem specyficznych przeciwciał i skierowanych przeciwko nim przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym w zakresie podczerwieni. Wizualizację przeprowadzono z użyciem aparatu Odyssey CLx Imaging System LI-COR.

Co ciekawe w komórkach typu dzikiego zaobserwowano translokację cytoplazmatyczno-jądrową podjednostki RelA i c-Rel, a także korespondujący z fosforylacją p105 przyrost poziomu białka p50. Natomiast we frakcjach jądrowych otrzymanych z komórek z nokautem genu kodującego białko Mal zidentyfikowano jedynie podjednostkę RelA (Ryc. 6.10.2.2.). Uzyskany wynik wskazuje, że powstawanie kompleksu c-Rel/p50 regulowane jest na drodze zależnej od białka Mal.

7 PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Przeprowadzone badania wykazały, że:

- Białko Mal jest niezbędne do zależnej od receptora Toll-podobnego 9 aktywacji ekspresji genów kodujących IFN β i TNF α w makrofagach mysich i ludzkich oraz w ludzkich komórkach PBMC.
- Mal reguluje aktywowaną przez TLR9 fosforylację kinaz ERK1/2 w makrofagach po stymulacji HSV-1 lub syntetycznym oligonukleotydem bogatym w niemetylowane CpG. Aktywność kinaz ERK1/2 wymagana jest do zależnej od TLR9 indukcji ekspresji *IFNB1* i *TNF*.
- Fosforylacja kinaz ERK1/2 w szlaku zależnym od TLR9/Mal nie jest regulowana przez kinazy BTK oraz Tpl-2, jednakże zahamowanie aktywności Tpl-2 blokuje ekspresję *Ifnb1* i osłabia *Tnf*.
- W proces indukcji ekspresji *Ifnb1* i *Tnf* zależnej od TLR9 zaangażowana jest kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K).
- Białko Mal wykazuje zdolność do interakcji z Atg16L1 – białkiem wchodzącym w skład kompleksu biorącego udział w tworzeniu autofagosomów.
- NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywującym ekspresję genów na drodze zależnej od TLR9/Mal.
- Białko Mal warunkuje translokację cytoplazmatyczno-jądrową dimeru c-Rel/p50.

8 DYSKUSJA WYNIKÓW

Od momentu odkrycia białko Mal było uważane za białko adaptorowe receptorów Toll-podobnych zakotwiczonych w błonie komórkowej. Pionierskie badania dotyczące szlaków sygnałowych zależnych od TLR pokazywały, że Mal nie jest angażowany przez receptory endosomalne, m.in. przez TLR9. Potwierdzały to eksperymenty, w których wykorzystano komórki z nokautem genu kodującego Mal, bowiem nie obserwowano w nich zahamowania produkcji cytokin w odpowiedzi na aktywację TLR9 (116). Kotwiczenie Mal wyłącznie do błonowych TLR uzasadniała również jego budowa, a mianowicie obecność *N*-terminalnej domeny preferencyjnie wiążącej fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan, który w przewodzie występuje w tratwach lipidowych błony komórkowej (114-116). Doniesienia literaturowe na temat białka Mal dotyczyły głównie kaskad sygnałowych receptorów TLR4 i TLR2. Rozwiązanie struktury krystalicznej Mal pozwoliło na dokładne, jak się wydawało, określenie funkcji tego adaptora. Postulowano, że Mal w swej domenie TIR posiada rejony o negatywnym ładunku, umożliwiające oddziaływanie regionów TIR receptora TLR4 i białka adaptorowego MyD88, które w całości naładowane są dodatnio (122, 123).

Już wcześniej pojawiły się pewne przesłanki sugerujące, że Mal może dokować się do innych lipidów, m.in. obecnych w błonie endosomu reszt fosfatydyloinozytolo-3-fosforanu (PI(3)P) oraz fosfatydyloseryny (PS), a tym samym uczestniczyć w organizowaniu struktur Myddosome'u na domenach TIR wewnątrzkomórkowych receptorów Toll-podobnych. Jednakże obserwacje te były marginalizowane ze względu na założenie, że adaptor MyD88 bezpośrednio oddziałuje z domenami TIR receptorów zakotwiczonych w pęcherzykach endosomalnych (118). Przypuszczenia te wysnuto na podstawie wspomnianych już obserwacji uzyskanych z wykorzystaniem komórek z nokautem Mal, w których przekazanie sygnału od wewnątrzkomórkowych TLR nie zostało zaburzone. Jednakże, najprawdopodobniej w badaniach tych uzyskano efekty niespecyficzne spowodowane zastosowaniem zbyt wysokich stężeń ligandów (116, 180). Ponadto w piśmiennictwie pojawiały się informacje, z których wynikało, że w systemach dwuhybrydowych białko MyD88 oddziałuje bezpośrednio jedynie z nielicznymi TLR i nie ma możliwości wiązania TLR9. Postulowano także istnienie odrębnego białka, które, tak jak Mal dla TLR4, byłoby pomostem między MyD88 a domeną TIR TLR9 (181, 182).

W roku 2010 potwierdzono, że białko Mal jest angażowane w szlak sygnałowy receptora TLR3. Było to pierwsze doniesienie o udziale białka Mal w kaskadzie sygnałowej TLR z grupy receptorów endosomalnych aktywowanych kwasami nukleinowym. Jak pokazano, w tym konkretnym przypadku, Mal jest regulatorem negatywnym, gdyż wiążąc się z czynnikiem transkrypcyjnym IRF7 może blokować jego rekrutację do domeny PRDI-III enhanceosomu *IFNB1*, upośledzając tym samym syntezę IFN β (183). Jest to mechanizm nietypowy, uniezależniony od homotypowego oddziaływania domen TIR. Ponadto TLR3 jako jedyny

receptor Toll-podobny wykorzystuje do przekazania sygnału wyłącznie adaptor TRIF bez udziału MyD88 (41, 184), dlatego też bezpośrednie przełożenie takiego mechanizmu na pozostałe endosomalne TLR było nieuprawnione.

Wreszcie w roku 2014 zespół kierowany przez Kagana zweryfikował otrzymane wcześniej dane dotyczące kotwiczenia się Mal preferencyjnie do mikrodomen błony komórkowej bogatych w PI(4,5)P₂. Okazało się, że białko to ma możliwość wiązania szerokiego spektrum reszt lipidowych prezentowanych w błonach biologicznych, również endosomalnych (185).

Badania omawiane w niniejszej rozprawie wskazują, że Mal bierze udział w przekazaniu sygnału przez receptor TLR9, a uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z danymi opublikowanymi przez Bonhama i wsp., z których wynika, iż białko Mal kotwiczone jest zarówno do błonowych tratw lipidowych, jak i do endosomów. Fakt ten wspiera hipotezę, że białko to jest wspólnym łącznikiem domen TIR receptorów Toll-podobnych i białka MyD88. Zatem wszystkie receptory, których szlak sygnałowy angażuje MyD88 wiążą adaptor Mal (185).

Pierwsze etapy badań omawianych w niniejszej pracy przeprowadzono stosując naturalny ligand receptora TLR9, jakim jest wirus opryszczki pospolitej typu I (HSV-1).

Wiele receptorów będących tzw. pierwszą linią obrony komórki przed inwazją patogenów jest angażowanych w rozpoznawanie tego wirusa, począwszy od TLR powierzchniowych aktywowanych glikoproteinami wirusowymi, poprzez TLR endosomalne, na sensorach cytozolowych kwasów nukleinowych skończywszy (186, 187). Wśród receptorów Toll-podobnych trzy: TLR2, TLR9 i TLR3 rozpoznają komponenty wirusa HSV-1. TLR2 jest receptorem dla glikoprotein osłonki, TLR9 wiąże DNA wirusa, natomiast TLR3 aktywowany jest przez powstający podczas replikacji dsRNA (166, 172, 188). Po aktywacji wymienionych wyżej receptorów uruchamiane są szlaki sygnałowe prowadzące do indukcji przeciwwirusowych interferonów i cytokin prozapalnych. Genom wirusa opryszczki typu I zawiera kilka genów kodujących białka warunkujące blokowanie tych szlaków i tym samym umożliwiającym uniknięcie indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej. Co ciekawe, celem jednego z białek warunkujących ucieczkę HSV-1 przed mechanizmami obronnymi komórki jest białko Mal. Bowiem kodowane przez HSV-1 natychmiastowe-wczesne białko ICP0 (ang. *Infected Cell Protein 0*), dzięki aktywności E3 ligazy ubikwityny, ma możliwość skierowania adaptoru Mal, a także MyD88, do degradacji proteasomalnej, tym samym upośledzając przekazanie sygnału od receptora TLR2 (189).

Wiadomym jest, że HSV-1 jest wirusem neurotropowym, mającym zdolność do ustanawiania zakażeń latentnych. Wykazano związek między zakażeniem HSV-1 a patogenezą zapalenia mózgu, w tym konkretnym przypadku zwanym opryszczkowym zapaleniem mózgu (ang. *Herpes Simplex Encephalitis, HSE*) (161).

W stanach infekcji ochronną rolę dla ośrodkowego układu nerwowego pełnią komórki mikrogleju rozpoznające i usuwające patogeny, które przekroczyły barierę krew-mózg (190). Mając to na uwadze do badań wykorzystano linię ludzkiego mikrogleju CHME-5. Komórki infekowano szczepem wirusa, oryginalnie pochodzącym od pacjenta, u którego rozwinęło się opryszczkowe zapalenie mózgu (191). Dane pokazane na rycinie 6.1.2. wskazują, że indukowana przez HSV-1 odpowiedź odpornościowa, objawiająca się ekspresją genów kodujących IFN β i TNF α , jest regulowana przez Mal, gdyż wyciszenie genu kodującego Mal hamowało produkcję badanych cytokin.

Do tej pory tylko Bonham i wsp. postulowali, że aktywacja TLR9 przez HSV-1 bądź ligand syntetyczny indukuje ekspresję cytokin zależną od obecności Mal, nie wyjaśniając jednak mechanizmu regulacji szlaku sygnałowego (185). W opisanych przez tę grupę badawczą eksperymentach zastosowano szczepy KOS A i KOS CE wirusa, które indukują zależną od TLR9 i niezależną od TLR2 odpowiedź odpornościową. Jednakże w badaniach tych pominięto udział innych potencjalnych sensorów DNA, które mogłyby w pewnych warunkach być aktywowane genomem HSV-1 (192, 193). Z uwagi na powstałe niejasności w niniejszej pracy zastosowano syntetyczny oligonukleotyd blokujący TLR9 (INH-1 ODN), co umożliwiło potwierdzenie znaczenia receptora TLR9 w rozpoznawaniu genomu HSV-1 przez komórki CHME-5 (Ryc. 6.1.3.) (194).

Z uwagi na fakt, że linia CHME-5 jest linią embrionalną, poddaną dodatkowo na potrzeby eksperymentów omawianych w niniejszej pracy transdukcji lentiwirusowej, efekty obserwowane na tym modelu badawczym potwierdzono również na ludzkich komórkach PBMC izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców. Dodatkowo w badaniach z wykorzystaniem PBMC zastosowano syntetyczny oligonukleotyd zawierający niemetylowane sekwencje CpG, który jest specyficznym aktywatorem TLR9. Jak wspomniano w rozdziale Wstęp, istnieją trzy podstawowe struktury syntetycznych oligonukleotydów z sekwencjami CpG: multimeryczne CpG-A, monomeryczne CpG-B i CpG-C - łączące cechy form A i B (195). Różnice strukturalne między tymi oligonukleotydami determinują różne czasy migracji przez pęcherzyki endosomalne, co skutkuje ekspresją różnych repertuarów cytokin. W badaniach użyto CpG-C ODN, ponieważ posiada on sekwencję palindromową, odpowiedzialną za aktywację TLR9 we wczesnych i późnych endosomach. Co więcej, w eksperymentach z wykorzystaniem PBMC zastosowano odmienny mechanizm blokowania funkcji Mal, a mianowicie zahamowanie oddziaływania domen TIR adaptora Mal z innymi białkami specyficznym peptydem inhibitorowym MalIP. Zarówno w komórkach infekowanych HSV-1, jak i stymulowanych CpG-C ODN w obecności peptydu blokującego Mal, obserwowano spadek indukcji ekspresji mRNA *IFNB1* (Ryc. 6.2.1.). Zatem różne mechanizmy „wyłączenia” Mal, tj. wyciszenie ekspresji genu lub fizyczne zablokowanie interakcji białka Mal z Myddosomem i TLR9 prowadziły do zbieżnych obserwacji eksperymentalnych.

Rola adaptoru MyD88 w szlaku sygnałowym receptora TLR9 jest dobrze udokumentowana. Uruchomienie kaskady sygnałowej zależnej od MyD88 skutkuje translokacją do jądra komórkowego czynnika NF- κ B, będącego kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym reakcję zapalną. NF- κ B w komórkach spoczynkowych utrzymywany jest w cytoplazmie przez I κ B α , co zapobiega jego wiązaniu z odpowiednimi sekwencjami DNA w jądrze. Degradacja I κ B α będąca skutkiem aktywacji szlaków sygnałowych uwalnia NF- κ B i umożliwia indukcję ekspresji genów (183, 196). Równolegle, z danych literaturowych wynika, że pod wpływem aktywacji receptorów Toll-podobnych angażujących adaptor Mal, dochodzi do fosforylacji kinaz z rodziny MAP m.in. ERK1/2 oraz p38.

Uzyskane w toku realizacji badań do niniejszej pracy wyniki potwierdziły, że w komórkach CHME-5 infekowanych HSV-1 dochodzi do zależnej od Mal fosforylacji kinaz ERK1/2. Natomiast, co zaskakujące nie obserwowano spodziewanej degradacji podjednostki inhibitorowej czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (Ryc. 6.3.1.).

Planując kolejne eksperymenty wzięto pod uwagę doniesienia literaturowe dotyczące mechanizmu działania inhibitorowych oligonukleotydów (INH-ODN), które sugerowały możliwość zaistnienia efektów niespecyficznych, wywołanych bezpośrednią interakcją oligonukleotydów z HSV-1 i zaburzenia replikacji wirusa (197). Efektywne wiązanie genomu HSV-1 do TLR9 nie jest uzależnione od wcześniejszej replikacji wirusowego materiału genetycznego. Pokazano, że HSV-1 inaktywowany promieniowaniem UV był nadal rozpoznawany przez TLR9 i wzbudzał aktywację odpowiedzi odpornościowej. Dlatego też ewentualne oddziaływanie INH-ODN z HSV-1 nie powinno zaburzać rozpoznania materiału genetycznego wirusa przez ten receptor (60). Ponadto w badaniach opisanych w niniejszej pracy wykorzystano odmienny inhibitor niż omawiany w przytoczonym doniesieniu, a efekty niespecyficzne prezentowane przez INH-1 ODN nie są znane.

Jednakże kontrowersje dotyczące potencjalnego niespecyficznego oddziaływania INH-1 ODN z wirusem HSV-1, jak i samo zastosowanie HSV-1 jako liganda dla TLR9 były podstawą do zaangażowania dodatkowego modelu badawczego, a mianowicie unieśmiertnionych mysich makrofażów różnicowanych ze szpiku kostnego (BMDM). Unieśmiertnione linie komórkowe pochodziły z myszy typu dzikiego oraz z nokautem genu kodującego białko Mal, co wyeliminowało konieczność wykonywania pewnych procedur eksperymentalnych, jak przejściowe wyciszenie genu *TIRAP* techniką shRNA czy też blokowanie oddziaływań TIR-TIR specyficznym peptydem, niezależnie tym samym powtarzalność wyników od uzyskanego poziomu zahamowania funkcji Mal. Ponadto, w badaniach dotyczących mechanizmu regulacji szlaku sygnałowego TLR9 przez białko Mal w komórkach BMDM, HSV-1 zastąpiono ligandem syntetycznym, CpG-C ODN.

Ekspresja genów kodujących badane cytokiny, IFN β i TNF α , aktywowana przez CpG-C była znacznie zmniejszona w komórkach BMDM z niedoborem Mal w porównaniu do komórek

typu dzikiego, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Bonhama i współpracowników (Ryc. 6.4.2.1. i 6.4.2.2.) (185).

Dalsze badania pozwoliły na określenie mechanizmu regulacji odpowiedzi odpornościowej zależnej od TLR9 przez białko Mal. Poddano analizie aktywację wybranych białek kaskady sygnałowej zależnej od TLR9 oraz jego interakcji z MyD88 i zaobserwowano zahamowanie fosforylacji ERK1/2 w komórkach z nokautem genu dla Mal (Ryc. 6.5.1.). Informacje dostępne w piśmiennictwie nie wyjaśniają czy indukowana przez TLR9 ekspresja genów dla cytokin związana jest z aktywacją ERK1/2. Mimo, że dotychczasowe badania skupiające się na szlakach TLR2 i 4 pokazały zależną od adaptora Mal aktywację ERK1/2 to rola tych kinaz w szlaku TLR9/Mal/MyD88 nie została szczegółowo poznana.

Eksperymenty opisane w niniejszej pracy wyraźnie wskazują, że fosforylacja ERK1/2 aktywowana CpG-C zachodziła jedynie w komórkach WT, a inhibitor farmakologiczny ERK1/2 (FR180204) powodował zahamowanie wytwarzania cytokin (Ryc. 6.5.2.1. i 6.5.2.2.). Otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi uzyskanymi z użyciem mysich makrofagów linii J774. Pokazano, że w komórkach tych CpG nie indukowało istotnej fosforylacji ERK1/2 w ciągu 60 minut (198). Natomiast w mysich BMDM fosforylacja ERK1/2 na drodze zależnej od TLR9 charakteryzowała się opóźnioną kinetyką. Jak pokazano, efekt ten związany był z zależną od Tpl2 aktywacją oksydazy NADPH, a następnie autokrynną aktywacją ERK1/2 przez reaktywne formy tlenu (199).

Z uwagi na fakt, że mechanizm prowadzący do fosforylacji ERK1/2 na drodze zależnej od TLR9/Mal nie jest znany postanowiono zweryfikować potencjalny udział w tym procesie dwóch kinaz białkowych, a mianowicie kinazy Brutona i Tpl-2. Białka te zostały wytypowane do analizy na podstawie dostępnych danych literaturowych sugerujących bezpośrednie oddziaływanie kinazy Brutona z białkiem Mal oraz zaangażowanie Tpl-2 w aktywację kinaz MEK1/2.

Kinaza Brutona (BTK) jest członkiem rodziny kinaz treoninowych Tec i została poznana jako białko regulujące mechanizmy związane z rozwojem i różnicowaniem limfocytów B, a także przekazywaniem sygnału od receptora BCR. Mutacje genu kodującego BTK są przyczyną agammaglobulinemii sprzężonej z chromosomem X (XLA) i objawiają się niedoborem limfocytów B we krwi (200). Od kilkunastu lat badana jest także rola BTK w szlakach sygnałowych receptorów Toll-podobnych. Wykazano możliwość bezpośredniego oddziaływania BTK z domenami TIR m.in. z Mal, TLR4, TLR6, TLR8, TLR9, jak i MyD88, a także kinazą IRAK1 (201).

Jak pokazano, podczas stymulacji komórek ligandami dla TLR2 i TLR4, odpowiednio MALP-2 i LPS, dochodziło do zależnej od BTK aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co udowodniono stosując farmakologiczny inhibitor kinazy. Szczegółowa analiza tego efektu wykazała, że po aktywacji wymienionych receptorów swoistymi ligandami, białko adaptorowe

Mal było fosforylowane przez BTK na trzech resztach tyrozyny (Y86, Y106, Y187). Spośród nich dwie, Y86 i Y106, były krytyczne dla aktywacji NF- κ B, gdyż ich zamiana na alaninę skutkowała osłabieniem wiązania się tego czynnika do właściwej mu sekwencji reporterowej (119).

W komórkach z nokautem genu kodującego BTK obserwowano dysregulację produkcji cytokin w odpowiedzi na LPS i CpG. Z jednej strony poziom przeciwwzapalnej IL-10 był obniżony w stosunku do komórek wykazujących prawidłową ekspresję genu dla BTK, z drugiej natomiast produkcja prozapalnej IL-6 była podwyższona. Prawdopodobnie zawyżony poziom produkcji IL-6 w komórkach z nokautem BTK wynikał właśnie z niedoboru IL-10. Drugim możliwym wyjaśnieniem takiego efektu była zaburzona aktywacja kinaz z rodzin MAP. Bowiem w komórkach z nokautem BTK dochodziło do wzmocnionej i długotrwałej aktywacji kinaz ERK1/2. Sugeruje to, że BTK działając na szlaki sygnałowe zależne od TLR może wpływać na utrzymanie równowagi pomiędzy syntezą cytokin przeciw i prozapalnych (197).

Biorąc pod uwagę doniesienia o współdziałaniu receptorów TLR2 i TLR9 w rozpoznawaniu np. zakażeń HSV-1 wydaje się prawdopodobne, że BTK może pośredniczyć w łączeniu i synergistycznym działaniu szlaków zależnych od TLR bądź też ich wzajemnej negatywnej regulacji, co pozwala zapobiegać niekontrolowanemu rozwojowi procesu zapalnego.

Co ciekawe, inny zespół badawczy pokazał, że fosforylacja Mal przez BTK w szlaku sygnałowym TLR2 i TLR4 jest przejściowa i skutkuje szybką degradacją białka adaptorowego. Fosforylacja ta jest prawdopodobnie wymagana do rekrutacji ligazy E3 ubikwityny, SOCS-1, a następnie poliubikwitynacji Mal na resztach K15 i K16, co z kolei kieruje Mal do proteasomu. Sugerowano, że szybka degradacja Mal stanowi mechanizm negatywnej regulacji szlaków zależnych od TLR2 i TLR4, zapobiegający powstawaniu przewlekłego stanu zapalnego (198). Zaskakujące jest jednak to, że w komórkach stymulowanych ligandem TLR9 nie obserwowano degradacji Mal, będącej następstwem fosforylacji zależnej od BTK, co po raz kolejny miało dowodzić, iż Mal nie jest angażowany w szlak sygnałowy zależny od tego receptora (198).

W toku przeprowadzonych badań nie potwierdzono udziału BTK w szlaku zależnym od TLR9/Mal. Zastosowanie inhibitora farmakologicznego BTK, LFM-A13, nie zaburzyło fosforylacji ERK1/2 aktywowanej przez CpG-C ODN (Ryc. 6.6.1.), nie wyklucza to jednak bezpośredniego oddziaływania kinazy z białkiem Mal.

Zgodnie z piśmiennictwem kinazą odpowiedzialną za aktywację ERK1/2 w szlakach sygnałowych zależnych od TLR jest Tpl2 (MAP3K8) – kinaza serynowo-treoninowa z rodziny MAP (MAP3K) zidentyfikowana jako protoonkogen (199). Z badań wynika, że kinaza Tpl2 może tworzyć kompleks z prekursorem podjednostki p50 NF- κ B, a mianowicie p105. Kompleks ten stabilizuje kinazę, a także zapobiega jej niepożądaną aktywacji. W następstwie stymulacji makrofagów LPS, p105 zostaje skierowane do degradacji proteasomalnej, a Tpl-2 ulega

autofosforylacji. Uwolniona kinaza Tpl-2 może aktywować MEK1/2, których substratem są kinazy ERK1/2 (148).

Rola Tpl2 w szlakach sygnałowych receptorów Toll-podobnych pozostaje kwestią sporną wśród badaczy. Istnieją doniesienia sugerujące, że kinaza ta może negatywnie regulować ekspresję genu kodującego IFN β w makrofagach i mDC stymulowanych ligandami dla TLR4 i TLR9. Co ciekawe i w tym wypadku efekt uzależniony był od modulacji aktywności kinaz ERK1/2, które nie ulegały fosforylacji w komórkach z nokautem genu dla Tpl-2 (202).

Uzyskane dane potwierdziły, że pomimo braku korelacji między zahamowaniem kinazy Tpl-2 inhibitorem farmakologicznym, a fosforylacją ERK1/2 (Ryc. 6.7.1.), kinaza Tpl2 pełni istotną rolę w indukcji ekspresji *IFNBI* (Ryc. 6.7.2.). Dokładne wyjaśnienie tego procesu wymaga jednak dalszych badań.

Tradycyjnymi procesami unieszkodliwiania patogenów przez komórki żerne, takie jak makrofagi, są fagocytoza lub endocytoza, podczas których uruchamiane są rozmaite szlaki sygnałowe prowadzące do wzbudzenia odpowiedzi odpornościowej. Wirusy wykształciły jednak strategię ucieczki bądź omijania klasycznych ścieżek unikając tym samym rozpoznania przez mechanizmy wczesnego reagowania, jakimi są receptory TLR. Dlatego pewne procesy zachodzące w komórce, które niegdyś nie były wiązane z odpowiedzią odpornościową, okazały się dodatkowym elementem zabezpieczającym organizm przed rozwojem infekcji.

Jednym z takich mechanizmów jest autofagia, której głównym przeznaczeniem jest degradacja agregatów białkowych oraz wadliwych organelli. W procesie autofagii następuje wyodrębnienie obszarów cytoplazmy, które otaczane są błoną izolacyjną, formując tzw. fagofor. Następnie błona ta ulega elongacji i zamknięciu tworząc autofagosom. Kolejnym etapem dojrzewania autofagosomów jest fuzja z lizosomami, dzięki której dostarczane są enzymy lityczne warunkujące degradację cargo.

Początkowe badania dotyczące procesów związanych z autofagią skupione były na jej roli w usuwaniu endogennych białek lub całych organelli. Jednakże okazało się, że izolacja fragmentów cytoplazmy jest też najprawdopodobniej strategią komórki w usuwaniu bytujących w niej patogenów, w tym wirusów m.in. HSV-1 (203). Proces ten został nazwany ksenofagią (ang. *Xenophagy*), dla odróżnienia go od klasycznej autofagii, mimo że oba angażują tę samą maszynę molekularną (204).

Ponadto dane sugerują, że kolejne etapy dojrzewania autofagosomów warunkowane dołączaniem endosomów, umożliwiając zetknięcie się ładunku pęcherzyka z receptorami Toll-podobnymi, a w konsekwencji rozpoznanie specyficznych ligandów, jakimi są wirusowe kwasy nukleinowe i aktywację zależnych od TLR kaskad sygnałowych. Ponadto, zgodnie z piśmiennictwem, podczas autofagii indukowanej głodzeniem komórek ekspresja genów kodujących receptory Toll-podobne jest znacznie podwyższona. Sugeruje to związek autofagii

z rozpoznawaniem patogenów wewnątrzkomórkowych, w tym wirusów, na drodze zależnej od TLR.

Materiał genetyczny wirusa może znaleźć się w autofagosomie w następstwie rozmaitych mechanizmów. Po sekwestracji fragmentu cytoplazmy przez formujący się fagofor, kapsyd bytującego w niej wirusa zostaje zdegradowany dzięki proteazom dostarczonym wraz z lizosomem, a genom jest uwalniany do światła pęcherzyka. Wirusowy materiał genetyczny może też być dostarczony do cytoplazmy bezpośrednio na drodze fuzji otoczki i błony komórkowej, a następnie zostać pochłonięty przez fagofor. Ponadto, dane sugerują proteosomalną degradację kapsydu, gdyż pokazano, że HSV-1 podlega ubikwitynacji i zostaje skierowany do proteasomu 26S, co skutkuje uwolnieniem genomu (205), który następnie może zostać wyizolowany przez maszynię molekularną związaną z autofagią (206).

Jednym z pierwszych etapów tworzenia się autofagosomów jest fosforylacja fosfatydyloinozytoli obecnych w błonach biologicznych przez kinazę PI3 (207). Uważa się, że anionowe reszty fosfatydyloinozytoli stanowią kod rekrutacji białek wiążących lipidy do poszczególnych błon biologicznych (208). Ufosforylowana forma fosfatydyloinozytoli (PI(3)P) rozpoznawana jest przez białko WIPI2b, które następnie rekrutuje do membrany izolacyjnej kompleksy białek Atg kontrolujące proces formowania i dojrzewania autofagosomów (209).

Inhibitory PI3K są powszechnie stosowane jako czynniki hamujące autofagię. Mimo braku specyficzności w kierunku PI3K klasy III, bowiem inhibitory te blokują też PI3K klasy I, uważa się, że hamują autofagię poprzez blokowanie fosforylacji fosfatydyloinozytoli do fosfatydyloinozytoli-3-fosforanu (207).

Zaobserwowano, że zahamowanie aktywności PI3K inhibitorem 3-metyloadeniną prowadziło do obniżenia ekspresji genów kodujących IFN β i TNF α w komórkach CHME-5 infekowanych HSV-1, ale także BMDM WT traktowanych CpG-C (Ryc. 6.8.1.1. i 6.8.1.2.), co sugeruje, że autofagia może być jednym z procesów zaangażowanych do eradykacji HSV-1 w makrofagach.

W skład kompleksu PI3K zaangażowanego w inicjację autofagii wchodzi białko Beclin-1, która inicjuje proces powstawania fagoforu. Interesującym jest fakt, że wirus HSV-1 ma zdolność ingerencji w ten proces. W obrębie materiału genetycznego wirusa obecny jest gen kodujący białko ICP34.5 niezbędne do replikacji HSV-1 w neuronach (210). Zaobserwowano, że białko to ma także zdolność do bezpośredniego oddziaływania z Becliną-1 wpływając tym samym na upośledzenie autofagii. Usunięcie z ICP34.5 domeny bbd (*ang. Beclin-1 binding domain*) odpowiedzialnej za tę interakcję, skutkowało obniżeniem poziomu replikacji wirusa, a w konsekwencji zmniejszeniem śmiertelności myszy w wyniku rozwinięcia wirusowego zapalenia mózgu (211). Mechanizm ten sugeruje, że autofagia jest jednym z elementów przeciwwirusowej obrony komórki.

Jak już wspomniano, fosforylacja PI do PI(3)P jest wstępnym etapem warunkującym organizację maszynerii molekularnej autofagii. Wiązanie się do powstającej membrany izolacyjnej kompleksów białek Atg umożliwia jej elongację i dojrzewanie autofagosomów. W początkowym etapie formowania autofagoforu krytyczny jest kompleks złożony z Atg5-Atg12/Atg16L1, mający aktywność podobną do E3-ligazy. Białko Atg16L odpowiada za prawidłowe dokowanie kompleksu do tworzącego się autofagoforu, zależne od interakcji z białkami wiążącymi PI(3)P. Zgodnie z danymi literaturowymi odpowiednie umiejscowienie tego kompleksu jest niezbędne do prawidłowej lipidacji białka LC3, czyli jego konwersji do LC3-II, a co za tym idzie dalszej elongacji autofagosomu (212). Badania pokazują, że aktywacja niektórych TLR, prowadziła do powstawania punktów LC3-II na błonie makrofagów, co bezpośrednio jest dowodem na angażowanie maszynerii autofagosomalnej przez szlaki sygnałowe TLR, jako że powstawanie LC3-II jest markerem autofagosomów (178).

W niniejszej pracy metodą koimmunoprecypitacji potwierdzono bezpośrednie oddziaływanie białka Mal z Atg16L1, które dodatkowo wzmagane było infekcją komórek HSV-1 (Ryc. 6.8.2.1.). Wydaje się, że w przypadku infekcji wirusowych Mal może być elementem rusztowania umożliwiającym tworzenie autofagosomów tuż przy endosomach, w błonach których zakotwiczone są receptory TLR. Dzięki temu komórka może w dwojaki sposób uchronić się przed dalszym rozwojem infekcji: po pierwsze materiał genetyczny wirusów, które zostały wychwycone przez autofagosomy zostaje dostarczony do właściwego im receptora, po drugie umożliwia to usunięcie wirusów, którym udało się wydostać z endosomu.

Analogiczny przypadek dokowania kompleksu Atg16L obserwowano po aktywacji receptorów Nod1 i Nod2 należących do grupy NLR, wiążących bakteryjne peptydoglikany. Pokazano ich bezpośrednie oddziaływanie z białkiem Atg16L1, co umożliwiło nukleację pęcherzyków autofagosomalnych przy błonie komórkowej, w miejscu wnikania bakterii z rodzaju *Salmonella* (213).

Mimo rosnącej liczby doniesień dotyczących udziału autofagii w usuwaniu patogenów z wnętrza komórki, badacze spierają się co do specyficzności samego procesu. Pokazano bowiem, że kompleks Atg16L może być zaangażowany w procesy lipidacji LC3 niezwiązane z autofagią, bądź też zbiorczo zwane autofagią niekanoniczną. Okazało się, że lipidacja LC3 zachodzi nie tylko podczas klasycznej autofagii, ale także w niektórych przypadkach fagocytozy, mikropinocytozy oraz podczas infekcji wirusowych. W tych przypadkach LC3 koniugowany był do reszt fosfatydyloetanolaminy błon endosomów. Co ciekawe niekanoniczne procesy lipidacji LC3 nie angażują typowej maszynerii związanej z autofagią, jak ULK1, PI3KC3 czy Atg9, wymagają jednakże kompleksów białkowych odpowiedzialnych za koniugację LC3 do reszt lipidowych czyli Atg3, Atg7 i kompleksu Atg12-Atg5-Atg16L1 (214).

Zgodnie z piśmiennictwem, receptor Toll-podobny 9 może indukować procesy częściowo angażujące białka związane z autofagią, przy czym są one również zaliczane do autofagii

niekanonicznej. Bowiem w skutek aktywacji TLR9 kompleksami DNA z autoprzeciwciałami, których obecność powiązana jest z chorobami autoimmunizacyjnymi jak np. toczeń rumieniowaty układowy, obserwowano indukcję fagocytozy i towarzyszącą jej rekrutację białka LC3 do powstających fagosomów, co z kolei warunkowało sekrecję IFN α . Mechanizm ten został nazwany fagocytozą związaną z LC3 (ang. *LC3-associated phagocytosis, LAP*) i jak sugerują dane pośredniczy on w sprzęganiu szlaków zależnych od fagocytozy i autofagii (2015). Ponadto pokazano znaczenie LAP w aktywacji receptora TLR9 ligandem syntetycznym dostarczczanym do komórek poprzez transfekcję z użyciem lipidów kationowych. Dowiedziono, że zaangażowana przez TLR9 kinaza IKK α , była rekrutowana do przestrzeni przybłonowej LAP-osomów przez białko LC3, co w następstwie umożliwiało aktywację czynnika transkrypcyjnego IRF7 i inicjację transkrypcji interferonów typu I (2016).

W świetle tych niejasności, rola białka adaptorowego Mal w autofagii pozostaje kwestią sporną mimo obserwowanej interakcji z Atg16L i wymaga dalszych badań.

Czynnik transkrypcyjny κ B odgrywa kluczową rolę w przebiegu odpowiedzi odpornościowej poprzez regulację ekspresji cytokin i chemokin (196, 217). Kanoniczna droga sygnalizacji NF- κ B obejmuje degradację podjednostki inhibitorowej I κ B α i translokację cytoplazmatyczno-jądrową heterodimeru RelA/p50 (217).

Analiza aktywacji poszczególnych białek szlaku sygnałowego TLR9 metodą Western Blotting nie wykazała degradacji I κ B α w odpowiedzi na stymulację komórek CpG-C ODN (Ryc. 6.5.1.). Była to nieoczekiwana obserwacja, gdyż NF- κ B jest aktywowany przez wszystkie znane ligandy TLR. Co zaskakujące, analiza reporterowa aktywacji pełnego promotora genu *IFNB1*, jak i jego poszczególnych domen regulatorowych (PRDI-IV) wykazała, że najsilniej regulowaną przez Mal domeną jest PRDII rekrutująca czynnik transkrypcyjny NF- κ B (Ryc. 6.9.1.1.). Potwierdzono również upośledzoną translokację NF- κ B do jądra w komórkach z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko Mal (Ryc. 6.10.1.1.). Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazujących różnice w translokacji podjednostek NF- κ B do jądra komórkowego w komórkach WT i MalKO, można założyć, że aktywacja TLR9/Mal/MyD88 prowadzi do aktywacji niekanonicznego szlaku sygnałowego NF- κ B: c-Rel/p105 (Ryc. 6.10.2.1. i 6.10.2.2.).

Najnowsze doniesienia innej grupy badawczej, dotyczące peptydów blokujących domenę TIR receptora TLR9 potwierdzają obserwacje uzyskane w niniejszej pracy, a także mogą tłumaczyć pewne niejasności. Otóż zespół zaproponował potencjalny model dokowania Mal do TLR9, w którym domeny TIR obu podjednostek receptora posiadają po cztery miejsca oddziaływania. Dwa z nich niezbędne są do dimeryzacji receptora, kolejne dwa miejsca pochodzące od jednej podjednostki TLR9 wiążą białko MyD88, natomiast dwa miejsca drugiej podjednostki receptora wiążą Mal. Takie rozwiązanie kompleksu mogłoby tłumaczyć, dlaczego

wyciszenie ekspresji *TIRAP* nie blokuje w całości sygnału płynącego od TLR9, np. translokacji podjednostki p65 NF- κ B, a jedynie prowadzi do jego osłabienia (218).

Co ciekawe, badania na myszach z nokautem p50, RelA i c-Rel wskazują, że NF- κ B odgrywa niewielką rolę w aktywacji ekspresji genu dla IFN β (219). W innych doniesieniach zaobserwowano pośrednie zaangażowanie NF- κ B w regulację produkcji IFN β , szczególnie w ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny YY1. Czynniki YY1 może działać jako aktywator lub represor transkrypcji w zależności od miejsca przyłączenia do promotora genu kodującego IFN β . W przypadku TLR3, który jest jedynym TLR funkcjonującym bez zaangażowania MyD88, wykazano, że podjednostki RelB i c-Rel są aktywowane, co prowadzi do indukcji i translokacji YY1 do jądra, gdzie działa jak represor transkrypcji, zapobiegając wiązaniu czynników transkrypcyjnych IRF z promotorem genu dla IFN β (183). Badania przeprowadzone w toku realizacji niniejszej pracy wykazały, że inhibitor translokacji jądrowej NF- κ B, JSH-23 silnie hamował ekspresję cytokin indukowanych CpG-C, co sugeruje istotną rolę dimeru c-Rel/p50 w tym szlaku.

Otrzymane dane pozostają zgodne z wynikami pokazanymi przez Bonhama i wsp. (185), które wskazują, że Mal może być kotwiczone nie tylko do tratw lipidowych błony komórkowej, ale także do pęcherzyków endosomalnych. Fakt ten potwierdza hipotezę, że Mal łączy się z domeną TIR wszystkich TLR, które angażują adaptor MyD88 w swoim szlaku sygnałowym.

Podsumowując, w oparciu o przytoczone wyniki własne oraz dostępne dane literaturowe, potwierdzono udział białka Mal w zależnej od TLR9 ekspresji genów kodujących IFN β i TNF α poprzez aktywację kinaz ERK1/2. Ponadto wykazano, że do inicjacji odpowiedzi zapalnej zależnej przez TLR9 i regulowanej przez Mal wymagany jest niekanoniczny szlak aktywacji NF- κ B.

9 WNIOSKI

1. Białko adaptorowe Mal jest zaangażowane w szlak sygnałowy receptora TLR9 i reguluje aktywację genów kodujących interferon β i TNF α
2. Mal bierze udział w regulacji aktywacji kinaz ERK1/2 aktywowanych przez TLR9
3. Obecność białka Mal wpływa na translokację jądrową czynnika NF κ B w komórkach stymulowanych ligandem dla TLR9
4. Na poziomie czynników transkrypcyjnych Mal reguluje formowanie dimeru cRel/p50
5. Białko adaptorowe Mal może być zaangażowane w proces niekanonicznej autofagii dzięki zdolności do interakcji z białkiem Atg16L1

Część wyników zawartych w niniejszej rozprawie doktorskiej została opublikowana w artykule:

Zyzak J., Mitkiewicz M., Leszczyńska E., Reniewicz P., Moynagh P.N., Siednienko J. (2019): HSV-1/TLR9-Mediated IFN β and TNF α Induction Is Mal-Dependent in Macrophages. *J Innate Immun.* 18.12.19 (online); DOI: 10.1159/000504542 (IF 2019 = 4,085)

Pozostałe publikacje własne

Prace oryginalne

1. Zabłocka A., Urbaniak A., Kuropatwa M., **Zyzak J.**, Rossowska J., Janusz M. (2014): Can proline-rich polypeptide complex mimic the effect of the nerve growth factor? *Biofactors* 7.07.2014 (online); DOI: 10.1002/biof.1174 (IF 2014 = 4,59)
2. Siednienko J., **Nowak J.**, Moynagh P.N., Gorczyca W.A. (2011): Nitric oxide affects IL-6 expression in human peripheral blood mononuclear cells involving cGMP-dependent modulation of NF- κ B activity. *Cytokine* 54(3):282-8. (IF 2011 = 3,1)

Publikacje przeglądowe:

1. Reniewicz P., **Zyzak J.**, Siednienko J. (2016): Komórkowe receptory egzogennej RNA. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2016;70:337-48 (IF 2015 = 0,769)
2. **Zyzak J.**, Matuszyk J., Siednienko J. (2013): Wieloetapowy proces dojrzewania receptora Toll-podobnego 9. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013; 67: 1034-1046 (IF 2013 = 0,63)

10 STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM

Toll-like receptors (TLRs) are an important group of proteins involved in activation of innate immune response. By binding structures known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), they activate plethora signaling pathways leading to the induction of expression, e.g. proinflammatory cytokines or type I interferons. TLRs are receptors anchored to the cell membrane or endosomes. Endosomal receptors are mainly responsible for the recognition of the nucleic acids of pathogens internalized by phagocytosis or endocytosis. They include, among others, TLR9 that binds fragments of bacterial and viral DNA rich in unmethylated cytosine-guanine dinucleotides (CpG). Correct ligand recognition depends on the multilevel process of receptor maturation and enables the recruitment of a protein complex called Myddosome. Until recently, it was suggested that MyD88 is recruited to TLR9 due to the direct TIR-TIR, excluding the involvement of adapter proteins in this process. Membrane TLRs incl. TLR2 and TLR4 anchors the Myddosome engaging the Mal adapter protein. Participation of Mal in endosomal TLR-dependent cascades was excluded, due to the preferential binding of PI(4,5)P₂, present in the cell membrane predominantly, by the adaptor protein.

The signal transmission from Myddosome in TLR9-dependent pathway allows the activation of transcription factors, namely NF- κ B, AP-1 and IRF family, which initiate the expression of genes encoding a repertoire of pro-inflammatory cytokines such as TNF α or IL-6, as well as type I interferons

The aim of this study was to investigate the effect of the Mal protein on the regulation of the signaling pathway initiated by the endosomal TLR9 receptor.

The results of the research allowed to identify the mechanism of regulation of the endosomal TLR9 receptor signaling pathway by the Mal protein, which until now has been associated mainly with receptors anchored in the cell membrane. In the first step, it was found that activation of TLR9 by both HSV-1 virus and synthetic CpG leads to *IFNB1* and *TNF* expression in an Mal-dependent pathway. Observations suggest that this protein is involved in the regulation of phosphorylation of the MAP family kinases, namely ERK1/2. The presence of the Mal protein regulates the non-canonical NF- κ B signaling cascade by activating the cytoplasmic-nuclear translocation of the c-Rel/p50 heterodimer, as manifested by decreased expression of the genes encoding IFN β and TNF α in Mal-deficient cells. In addition, a novel interaction of the Mal with the Atg16L1 protein involved in the autophagy process was identified.

Due to the participation of the TLR9 receptor in many disease processes, including in the course of encephalitis associated with HSV-1 infection (HSE - Herpes Simplex-1 Encephalitis), but also in autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus and psoriasis, it seems important to understand new mechanisms of innate immune response regulation, including TLR9-dependent response, which will enable the development of new antiviral therapies.

11 LITERATURA

1. Medzhitov R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity*. 2009;30(6):766-75.
2. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54 Pt 1:1-13.
3. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6):973-83.
4. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*. 1985;42(3):791-8.
5. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.
6. West AP, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:409-37.
7. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 2010;11:373.
8. Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, et al. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol*. 2001;167(7):3555-8.
9. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
10. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw*. 2000;11(3):362-71.
11. Du X, Poltorak A, Silva M, Beutler B. Analysis of Tlr4-mediated LPS signal transduction in macrophages by mutational modification of the receptor. *Blood Cells Mol Dis*. 1999;25(5-6):328-38.
12. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1429-31.
13. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1431-3.
14. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):168-79.
15. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*. 2002;3(7):667-72.
16. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009;458(7242):1191-5.
17. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 1999;189(11):1777-82.
18. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*. 2000;1(5):398-401.

19. Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudravalli R, Ross SR. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):2281-6.
20. Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(9):672-6.
21. Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev*. 2004;201:9-25.
22. Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, et al. Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2006;176(11):7021-7.
23. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. 2002;277(17):15028-34.
24. Cohen-Sfady M, Nussbaum G, Pevsner-Fischer M, Mor F, Carmi P, Zanin-Zhorov A, et al. Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *J Immunol*. 2005;175(6):3594-602.
25. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(4):331-42.
26. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.
27. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*. 2002;169(1):10-4.
28. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*. 2001;13(7):933-40.
29. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(25):13766.
30. Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, et al. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol*. 2002;76(17):8729-36.
31. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410(6832):1099-103.
32. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*. 2001;167(4):1882-5.
33. Chakrabarty P, Li A, Ladd TB, Strickland MR, Koller EJ, Burgess JD, et al. TLR5 decoy receptor as a novel anti-amyloid therapeutic for Alzheimer's disease. *J Exp Med*. 2018;215(9):2247-64.
34. Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1518(1-2):157-61.
35. Lee SM, Yip TF, Yan S, Jin DY, Wei HL, Guo RT, et al. Recognition of Double-Stranded RNA and Regulation of Interferon Pathway by Toll-Like Receptor 10. *Front Immunol*. 2018;9:516.

36. Regan T, Nally K, Carmody R, Houston A, Shanahan F, Macsharry J, et al. Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J Immunol.* 2013;191(12):6084-92.
37. Henrick BM, Yao XD, Zahoor MA, Abimiku A, Osawe S, Rosenthal KL. TLR10 Senses HIV-1 Proteins and Significantly Enhances HIV-1 Infection. *Front Immunol.* 2019;10:482.
38. Clemens MJ, Elia A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research.* 1997;17(9):503-24.
39. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001;413(6857):732- 8.
40. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN- β Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling. *The Journal of Immunology.* 2002;169(12):6668-72.
41. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-[beta] induction. *Nat Immunol.* 2003;4(2):161-7.
42. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science.* 2004;303(5663):1529-31.
43. Baum A, García-Sastre A. Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. *Amino Acids.* 2010;38(5):1283-99.
44. Uematsu S, Akira S. Toll-like Receptors and Type I Interferons. *Journal of Biological Chemistry.* 2007;282(21):15319-23.
45. Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science.* 2005;308(5728):1626-9.
46. Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, et al. Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity.* 2013;38(1):119-30.
47. Raetz M, Kibardin A, Sturge CR, Pifer R, Li H, Burstein E, et al. Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin. *J Immunol.* 2013;191(9):4818-27.
48. Shukla D, Chandel HS, Srivastava S, Chauhan P, Pandey SP, Patidar A, et al. TLR11 or TLR12 silencing reduces *Leishmania major* infection. *Cytokine.* 2018;104:110-3.
49. Shi Z, Cai Z, Sanchez A, Zhang T, Wen S, Wang J, et al. A Novel Toll-like Receptor That Recognizes Vesicular Stomatitis Virus. *Journal of Biological Chemistry.* 2011;286(6):4517-24.
50. Hidmark A, von Saint Paul A, Dalpke AH. Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *J Immunol.* 2012;189(6):2717-21.
51. Oldenburg M, Kruger A, Ferstl R, Kaufmann A, Nees G, Sigmund A, et al. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science.* 2012;337(6098):1111-5.
52. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408(6813):740-5.
53. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation,

- physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst.* 1984;72(4):955-62.
54. Yamamoto S, Kuramoto E, Shimada S, Tokunaga T. In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- α/β and γ with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res.* 1988;79(7):866-73.
55. Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J Immunol.* 1992;148(12):4072-6.
56. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 1995;374(6522):546-9.
57. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011;25(10):1010-22.
58. Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med.* 2000;192(4):595-600.
59. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;198(3):513-20.
60. Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood.* 2004;103(4):1433.
61. Delale T, Paquin A, Asselin-Paturel C, Dalod M, Brizard G, Bates EE, et al. MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN- α release and initiation of immune responses in vivo. *J Immunol.* 2005;175(10):6723-32.
62. Fiola S, Gosselin D, Takada K, Gosselin J. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2010;185(6):3620-31.
63. Coban C, Ishii KJ, Uematsu S, Arisue N, Sato S, Yamamoto M, et al. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol.* 2007;19(1):67-79.
64. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(6):1919-24.
65. Zauner L, Melroe GT, Sigrist JA, Rechsteiner MP, Dorner M, Arnold M, et al. TLR9 triggering in Burkitt's lymphoma cell lines suppresses the EBV BZLF1 transcription via histone modification. *Oncogene.* 2010;29(32):4588-98.
66. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007;449(7162):564-9.
67. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 2007;8(5):487-96.
68. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med.* 1997;186(10):1623-31.
69. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. Expert review of vaccines. 2011;10(4):499-511.
70. Dalpke AH, Zimmermann S, Albrecht I, Heeg K. Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative

- activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. *Immunology*. 2002;106(1):102-12.
71. Wu CC, Lee J, Raz E, Corr M, Carson DA. Necessity of oligonucleotide aggregation for toll-like receptor 9 activation. *J Biol Chem*. 2004;279(32):33071-8.
72. Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2000;164(3):1617-24.
73. Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, et al. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol*. 2004;34(1):251-62.
74. Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, et al. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33(6):1633-41.
75. Samulowitz U, Weber M, Weeratna R, Uhlmann E, Noll B, Krieg AM, et al. A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties. *Oligonucleotides*. 2010;20(2):93-101.
76. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):9237-42.
77. Chuang TH, Ulevitch RJ. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw*. 2000;11(3):372-8.
78. McKelvey KJ, Highton J, Hessian PA. Cell-specific expression of TLR9 isoforms in inflammation. *J Autoimmun*. 2011;36(1):76-86.
79. Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*. 2003;24(10):528-33.
80. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*. 2003;198(7):1043-55.
81. Leifer CA, Brooks JC, Hoelzer K, Lopez J, Kennedy MN, Mazzoni A, et al. Cytoplasmic targeting motifs control localization of toll-like receptor 9. *J Biol Chem*. 2006;281(46):35585-92.
82. Mouchess ML, Arpaia N, Souza G, Barbalat R, Ewald SE, Lau L, et al. Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity*. 2011;35(5):721-32.
83. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*. 2006;7(1):49-56.
84. Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DC, et al. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol*. 2007;8(7):772-9.
85. Ohto U, Shibata T, Tanji H, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, et al. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature*. 2015;520(7549):702-5.
86. Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol*. 2004;173(2):1179-83.

-
87. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol.* 2004;5(2):190-8.
 88. Avalos AM, Kirak O, Oelkers JM, Pils MC, Kim YM, Ottinger M, et al. Cell-specific TLR9 trafficking in primary APCs of transgenic TLR9-GFP mice. *J Immunol.* 2013;190(2):695-702.
 89. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim YM. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol.* 2007;177(2):265-75.
 90. Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, et al. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol.* 2006;7(2):156-64.
 91. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature.* 2008;452(7184):234-8.
 92. Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science.* 2006;314(5797):308-12.
 93. Lee BL, Moon JE, Shu JH, Yuan L, Newman ZR, Schekman R, et al. UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife.* 2013;2:e00291.
 94. Fukui R, Saitoh S, Matsumoto F, Kozuka-Hata H, Oyama M, Tabeta K, et al. Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J Exp Med.* 2009;206(6):1339-50.
 95. Fukui R, Saitoh S, Kanno A, Onji M, Shibata T, Ito A, et al. Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity.* 2011;35(1):69-81.
 96. Zanetti G, Pahuja KB, Studer S, Shim S, Schekman R. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat Cell Biol.* 2011;14(1):20-8.
 97. Chockalingam A, Brooks JC, Cameron JL, Blum LK, Leifer CA. TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. *Immunol Cell Biol.* 2009;87(3):209-17.
 98. Majer O, Liu B, Woo BJ, Kreuk LSM, Van Dis E, Barton GM. Release from UNC93B1 reinforces the compartmentalized activation of select TLRs. *Nature.* 2019;575(7782):371-4.
 99. Sepulveda FE, Maschalidi S, Colisson R, Heslop L, Ghirelli C, Sakka E, et al. Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity.* 2009;31(5):737-48.
 100. Matsumoto F, Saitoh S, Fukui R, Kobayashi T, Tanimura N, Konno K, et al. Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;367(3):693-9.
 101. Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, et al. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature.* 2008;456(7222):658-62.
 102. Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogoyo M, Barton GM. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med.* 2011;208(4):643-51.
 103. Onji M, Kanno A, Saitoh S-I, Fukui R, Motoi Y, Shibata T, et al. An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nature Communications.* 2013;4(1):1949.

104. Zyzak J, Matuszyk J, Siednienko J. [Multilevel maturation of Toll-like receptor 9]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013;67:1034-46.
105. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):353-64.
106. Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene*. 1990;5(7):1095-7.
107. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*. 1998;2(2):253-8.
108. Hardiman G, Rock FL, Balasubramanian S, Kastelein RA, Bazan JF. Molecular characterization and modular analysis of human MyD88. *Oncogene*. 1996;13(11):2467-75.
109. Gay NJ, Gangloff M, O'Neill LA. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol*. 2011;32(3):104-9.
110. Motshwene PG, Moncrieffe MC, Grossmann JG, Kao C, Ayaluru M, Sandercock AM, et al. An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *J Biol Chem*. 2009;284(37):25404-11.
111. Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. 2010;465(7300):885-90.
112. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, et al. Interferon-[alpha] induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*. 2004;5(10):1061-8.
113. Ning S, Campos AD, Darnay BG, Bentz GL, Pagano JS. TRAF6 and the Three C-Terminal Lysine Sites on IRF7 Are Required for Its Ubiquitination-Mediated Activation by the Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member Latent Membrane Protein 1. *Molecular and Cellular Biology*. 2008;28(20):6536-46.
114. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*. 2001;2(9):835-41.
115. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, et al. Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*. 2001;413(6851):78-83.
116. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*. 2002;420(6913):329-33.
117. Henneke P, Golenbock DT. TIRAP: how Toll receptors fraternize. *Nat Immunol*. 2. United States 2001. p. 828-30.
118. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-Mediated Adaptor Recruitment Controls Toll-like Receptor Signaling. *Cell*. 2006;125(5):943-55.
119. Siednienko J, Halle A, Nagpal K, Golenbock DT, Miggin SM. TLR3-mediated IFN-beta gene induction is negatively regulated by the TLR adaptor MyD88 adaptor-like. *Eur J Immunol*. 2010;40(11):3150-60.
120. Gray P, Dunne A, Brikos C, Jefferies CA, Doyle SL, O'Neill LA. MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *J Biol Chem*. 2006;281(15):10489-95.
121. Hughes MM, Lavrencic P, Coll RC, Ve T, Ryan DG, Williams NC, et al. Solution structure of the TLR adaptor MAL/TIRAP reveals an intact BB loop and supports MAL Cys91 glutathionylation for signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(32):E6480- e9.

122. Valkov E, Stamp A, Dimaio F, Baker D, Verstak B, Roversi P, et al. Crystal structure of Toll-like receptor adaptor MAL/TIRAP reveals the molecular basis for signal transduction and disease protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(36):14879-84.
123. Bovijn C, Desmet AS, Uyttendaele I, Van Acker T, Tavernier J, Peelman F. Identification of binding sites for myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) and Toll-like receptor 4 in MyD88 adapter-like (Mal). *J Biol Chem*. 2013;288(17):12054-66.
124. Ve T, Vajjhala PR, Hedger A, Croll T, DiMaio F, Horsefield S, et al. Structural basis of TIR-domain-assembly formation in MAL- and MyD88-dependent TLR4 signaling. *Nat Struct Mol Biol*. 2017;24(9):743-51.
125. Mansell A, Brint E, Gould JA, O'Neill LA, Hertzog PJ. Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol Chem*. 2004;279(36):37227-30.
126. Migglin SM, Pålsson-McDermott E, Dunne A, Jefferies C, Pinteaux E, Banahan K, et al. NF-kappaB activation by the Toll-IL-1 receptor domain protein MyD88 adapter-like is regulated by caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(9):3372-7.
127. Ulrichs P, Bovijn C, Lievens S, Beyaert R, Tavernier J, Peelman F. Caspase-1 targets the TLR adaptor Mal at a crucial TIR-domain interaction site. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 2):256-65.
128. Nagpal K, Plantinga TS, Wong J, Monks BG, Gay NJ, Netea MG, et al. A TIR domain variant of MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP results in loss of MyD88 binding and reduced TLR2/TLR4 signaling. *J Biol Chem*. 2009;284(38):25742-8.
129. Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, Dunne A, Murphy C, Ling EY, et al. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nature Genetics*. 2007;39(4):523-8.
130. Nejentsev S, Thye T, Szeszko JS, Stevens H, Balabanova Y, Chinbuah AM, et al. Analysis of association of the TIRAP (MAL) S180L variant and tuberculosis in three populations. *Nature Genetics*. 2008;40(3):261-2.
131. Miao R, Li J, Sun Z, Xu F, Shen H. Meta-analysis on the association of TIRAP S180L variant and tuberculosis susceptibility. *Tuberculosis*. 2011;91(3):268-72.
132. Hirotani T, Yamamoto M, Kumagai Y, Uematsu S, Kawase I, Takeuchi O, et al. Regulation of lipopolysaccharide-inducible genes by MyD88 and Toll/IL-1 domain containing adaptor inducing IFN-beta. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(2):383-92.
133. Jiang Z, Mak TW, Sen G, Li X. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(10):3533-8.
134. Han K-J, Su X, Xu L-G, Bin L-H, Zhang J, Shu H-B. Mechanisms of the TRIF-induced Interferon-stimulated Response Element and NF-kappaB Activation and Apoptosis Pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(15):15652-61.
135. Sasai M, Tatematsu M, Oshiumi H, Funami K, Matsumoto M, Hatakeyama S, et al. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Mol Immunol*. 2010;47(6):1283-91.
136. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, et al. IKK[epsilon] and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2003;4(5):491-6.

137. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003;4(11):1144-50.
138. Chan MP, Onji M, Fukui R, Kawane K, Shibata T, Saitoh S-i, et al. DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nature Communications.* 2015;6(1):5853.
139. Kerkmann M, Costa LT, Richter C, Rothenfusser S, Battiany J, Hornung V, et al. Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *J Biol Chem.* 2005;280(9):8086-93.
140. Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol.* 2001;166(4):2372-7.
141. Guiducci C, Ott G, Chan JH, Damon E, Calacsan C, Matray T, et al. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med.* 2006;203(8):1999-2008.
142. Honda K, Ohba Y, Yanai H, Negishi H, Mizutani T, Takaoka A, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature.* 2005;434(7036):1035-40.
143. Sasai M, Linehan MM, Iwasaki A. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science.* 2010;329(5998):1530-4.
144. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(8):594-606.
145. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity.* 2010;32(3):305-15.
146. Moncrieffe MC, Bollschweiler D, Li B, Penczek PA, Hopkins L, Bryant CE, et al. MyD88 Death-Domain Oligomerization Determines Myddosome Architecture: Implications for Toll-like Receptor Signaling. *Structure.* 2020;28(3):281-9.e3.
147. Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene.* 2001;20(44):6482-91.
148. Scheidereit C. IκB kinase complexes: gateways to NF-κB activation and transcription. *Oncogene.* 2006;25(51):6685-705.
149. Israël A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2010;2(3):a000158-a.
150. Ni C-Y, Wu Z-H, Florence WC, Parekh VV, Arrate MP, Pierce S, et al. Cutting Edge: K63-Linked Polyubiquitination of NEMO Modulates TLR Signaling and Inflammation In Vivo. *The Journal of Immunology.* 2008;180(11):7107.
151. Waterfield MR, Zhang M, Norman LP, Sun SC. NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Mol Cell.* 2003;11(3):685-94.
152. Pestka S. The Interferons: 50 Years after Their Discovery, There Is Much More to Learn. *Journal of Biological Chemistry.* 2007;282(28):20047-51.
153. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity.* 2019;50(4):907-23.
154. Noppert SJ, Fitzgerald KA, Hertzog PJ. The role of type I interferons in TLR responses. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(6):446-57.
155. Sin W-X, Li P, Yeong J, Chin K-C. Activation and regulation of interferon-β in immune responses. *Immunologic Research.* 2012;53(1):25-40.

-
156. Gabhann JN, Higgs R, Brennan K, Thomas W, Damen JE, Ben Larbi N, et al. Absence of SHIP-1 Results in Constitutive Phosphorylation of Tank-Binding Kinase 1 and Enhanced TLR3-Dependent IFN- β Production. *The Journal of Immunology*. 2010;184(5):2314-20.
 157. Fujita T, Ohno S, Yasumitsu H, Taniguchi T. Delimitation and properties of DNA sequences required for the regulated expression of human interferon-beta gene. *Cell*. 1985;41(2):489-96.
 158. Falvo JV, Parekh BS, Lin CH, Fraenkel E, Maniatis T. Assembly of a functional beta interferon enhanceosome is dependent on ATF-2-c-jun heterodimer orientation. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(13):4814-25.
 159. Panne D, Maniatis T, Harrison SC. An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell*. 2007;129(6):1111-23.
 160. Merika M, Williams AJ, Chen G, Collins T, Thanos D. Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell*. 1998;1(2):277-87.
 161. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet*. 2001;357(9267):1513-8.
 162. Heming JD, Conway JF, Homa FL. Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*. 2017;223:119-42.
 163. Miszczak D, Slonska A, Golke A, Cymerys J. Strategie przetrwania herpeswirusów – latencja i apoptoza. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013;67:276-87.
 164. Atanasiu D, Saw WT, Eisenberg RJ, Cohen GH. Regulation of Herpes Simplex Virus Glycoprotein-Induced Cascade of Events Governing Cell-Cell Fusion. *Journal of virology*. 2016;90(23):10535-44.
 165. Subramanian RP, Geraghty RJ. Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(8):2903-8.
 166. Sato A, Linehan MM, Iwasaki A. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(46):17343-8.
 167. Aravalli RN, Hu S, Rowen TN, Palmquist JM, Lokensgard JR. Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. *J Immunol*. 2005;175(7):4189-93.
 168. Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, et al. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(5):1315-20.
 169. Brun P, Scarpa M, Marchiori C, Conti J, Kotsafti A, Porzionato A, et al. Herpes Simplex Virus Type 1 Engages Toll Like Receptor 2 to Recruit Macrophages During Infection of Enteric Neurons. *Front Microbiol*. 2018;9:2148.
 170. Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(31):11416-21.
 171. Rasmussen SB, Sorensen LN, Malmgaard L, Ank N, Baines JD, Chen ZJ, et al. Type I interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-like receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. *J Virol*. 2007;81(24):13315-24.
 172. Davey GM, Wojtasiak M, Proietto AI, Carbone FR, Heath WR, Bedoui S. Cutting edge: priming of CD8 T cell immunity to herpes simplex virus type 1 requires cognate TLR3 expression in vivo. *J Immunol*. 2010;184(5):2243-6.
-

-
173. Boivin N, Menasria R, Piret J, Boivin G. Modulation of TLR9 response in a mouse model of herpes simplex virus encephalitis. *Antiviral Res.* 2012;96(3):414-21.
 174. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003;4(5):491-6.
 175. Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, Kim SY, Kloepfer AM, Hinkle G, et al. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell.* 2006;124(6):1283-98.
 176. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
 177. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
 178. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *The EMBO journal.* 2008;27(7):1110-21.
 179. Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(6):1889-92.
 180. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* 2002;420(6913):324-9.
 181. Brown V, Brown RA, Ozinsky A, Hesselberth JR, Fields S. Binding specificity of Toll-like receptor cytoplasmic domains. *European journal of immunology.* 2006;36(3):742-53.
 182. Ulrichts P, Peelman F, Beyaert R, Tavernier J. MAPPIT analysis of TLR adaptor complexes. *FEBS Letters.* 2007;581(4):629-36.
 183. Siednienko J, Maratha A, Yang S, Mitkiewicz M, Miggin SM, Moynagh PN. Nuclear factor κ B subunits RelB and cRel negatively regulate Toll-like receptor 3-mediated β -interferon production via induction of transcriptional repressor protein YY1. *J Biol Chem.* 2011;286(52):44750-63.
 184. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2002;169(12):6668-72.
 185. Bonham Kevin S, Orzalli Megan H, Hayashi K, Wolf Amaya I, Glanemann C, Weninger W, et al. A Promiscuous Lipid-Binding Protein Diversifies the Subcellular Sites of Toll-like Receptor Signal Transduction. *Cell.* 2014;156(4):705-16.
 186. Furr SR, Chauhan VS, Moerdyk-Schauwecker MJ, Marriott I. A role for DNA-dependent activator of interferon regulatory factor in the recognition of herpes simplex virus type 1 by glial cells. *Journal of neuroinflammation.* 2011;8:99-.
 187. Wang JP, Bowen GN, Zhou S, Cerny A, Zacharia A, Knipe DM, et al. Role of Specific Innate Immune Responses in Herpes Simplex Virus Infection of the Central Nervous System. *Journal of Virology.* 2012;86(4):2273.
 188. Sørensen LN, Reinert LS, Malmgaard L, Bartholdy C, Thomsen AR, Paludan SR. TLR2 and TLR9 Synergistically Control Herpes Simplex Virus Infection in the Brain. *The Journal of Immunology.* 2008;181(12):8604.
 189. van Lint AL, Murawski MR, Goodbody RE, Severa M, Fitzgerald KA, Finberg RW, et al. Herpes simplex virus immediate-early ICP0 protein inhibits Toll-like receptor 2-dependent inflammatory responses and NF-kappaB signaling. *J Virol.* 2010;84(20):10802-11.

190. Chen Z, Zhong D, Li G. The role of microglia in viral encephalitis: a review. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):76.
191. Szpara ML, Tafuri YR, Parsons L, Shreve JT, Engel EA, Enquist LW. Genome Sequence of the Anterograde-Spread-Defective Herpes Simplex Virus 1 Strain MacIntyre. *Genome announcements*. 2014;2(6):e01161-14.
192. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science*. 2013;339(6121):786.
193. Vance RE. Cytosolic DNA Sensing: The Field Narrows. *Immunity*. 2016;45(2):227-8.
194. Lenert P, Yasuda K, Busconi L, Nelson P, Fleenor C, Ratnabalasuriar RS, et al. DNA-like class R inhibitory oligonucleotides (INH-ODNs) preferentially block autoantigen-induced B-cell and dendritic cell activation in vitro and autoantibody production in lupus-prone MRL-Fas(lpr/lpr) mice in vivo. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):R79-R.
195. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(6):471-84.
196. Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 20):4589-92.
197. Sauter MM, Gauger JJ, Brandt CR. Oligonucleotides designed to inhibit TLR9 block Herpes simplex virus type 1 infection at multiple steps. *Antiviral Res*. 2014;109:83-96.
198. Yi A-K, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM. CpG Motifs in Bacterial DNA Activate Leukocytes Through the pH-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *The Journal of Immunology*. 1998;160(10):4755.
199. Kuriakose T, Rada B, Watford WT. Tumor progression locus 2-dependent oxidative burst drives phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase during TLR3 and 9 signaling. *J Biol Chem*. 2014;289(52):36089-100.
200. López-Herrera G, Vargas-Hernández A, González-Serrano ME, Berrón-Ruiz L, Rodríguez-Alba JC, Espinosa-Rosales F, et al. Bruton's tyrosine kinase—an integral protein of B cell development that also has an essential role in the innate immune system. *Journal of Leukocyte Biology*. 2014;95(2):243-50.
201. Jefferies CA, Doyle S, Brunner C, Dunne A, Brint E, Wietek C, et al. Bruton's Tyrosine Kinase Is a Toll/Interleukin-1 Receptor Domain-binding Protein That Participates in Nuclear Factor κ B Activation by Toll-like Receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(28):26258-64.
202. Kaiser F, Cook D, Papoutsopoulou S, Rajsbaum R, Wu X, Yang HT, et al. TPL-2 negatively regulates interferon-beta production in macrophages and myeloid dendritic cells. *J Exp Med*. 2009;206(9):1863-71.
203. Talloczy Z, Virgin HWt, Levine B. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy*. 2006;2(1):24-9.
204. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-75.
205. Horan KA, Hansen K, Jakobsen MR, Holm CK, Soby S, Unterholzner L, et al. Proteasomal degradation of herpes simplex virus capsids in macrophages releases DNA to the cytosol for recognition by DNA sensors. *J Immunol*. 2013;190(5):2311-9.
206. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):767-77.
207. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*. 2010;285(14):10850-61.
208. Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*. 2006;443(7112):651-7.

-
209. Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell*. 2014;55(2):238-52.
 210. Chou J, Kern ER, Whitley RJ, Roizman B. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science*. 1990;250(4985):1262-6.
 211. Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, et al. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe*. 2007;1(1):23-35.
 212. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*. 2008;19(5):2092-100.
 213. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhaes JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*. 2010;11(1):55-62.
 214. Fletcher K, Ulferts R, Jacquin E, Veith T, Gammoh N, Arasteh JM, et al. The WD40 domain of ATG16L1 is required for its non-canonical role in lipidation of LC3 at single membranes. *The EMBO Journal*. 2018;37(4):e97840.
 215. Henault J, Martinez J, Riggs JM, Tian J, Mehta P, Clarke L, et al. Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity*. 2012;37(6):986-97.
 2016. Hayashi K, Taura M, Iwasaki A. The interaction between IKK α and LC3 promotes type I interferon production through the TLR9-containing LAPosome. *Science signaling*. 2018;11(528):eaan4144.
 217. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680-4.
 218. Javmen A, Szmecinski H, Lakowicz JR, Toshchakov VY. Blocking TIR Domain Interactions in TLR9 Signaling. *J Immunol*. 2018;201(3):995-1006.
 219. Wang X, Hussain S, Wang EJ, Li MO, Garcia-Sastre A, Beg AA. Lack of essential role of NF-kappa B p50, RelA, and cRel subunits in virus-induced type 1 IFN expression. *J Immunol*. 2007;178(11):6770-6.