

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**David Krbušek**

Role RNA helikáz v antivirové obraně  
Role of RNA helicases in antiviral defense

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Václav Vopálenský, Ph.D.

Praha, 2019

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27. 12. 2019

David Krbušek

## **Abstrakt**

Virus hepatitidy typu C je významný lidský patogen, proti kterému dosud neexistuje imunizace. Po infekci je tento virus detekován imunitním systémem eukaryotické hostitelské buňky pomocí receptorů rozpoznávající molekulární vzory z rodiny RLR receptorů, které jsou součástí vrozeného imunitního systému. Tyto RLR receptory detekují přítomnost viru hepatitidy typu C a iniciují signální kaskádu spouštějící antivirovou imunitní odpověď. V této bakalářské práci je popsána a charakterizována role cytoplazmatických PRR účastnících se antivirové obrany při infekci eukaryotické buňky virem hepatitidy C.

## **Klíčová slova**

helikáza, RIG-I, MDA5, pattern-recognition receptors, HCV, virus

## **Abstract**

Hepatitis C virus is an important human pathogen against which there is no immunization yet. This virus is detected by the immune system of the eukaryotic host cell by pattern recognition receptors of the RLR receptor family, which is part of the innate immune system. These RLR receptors detect the presence of hepatitis C virus and initiate a signaling cascade triggering an antiviral immune response. In this thesis, the role of cytoplasmic PRRs involved in antiviral defense during hepatitis C virus infection of eukaryotic cells has been described and determined.

## **Key words**

Helicase, RIG-I, MDA5, pattern-recognition receptors, HCV, virus

## Seznam použitých zkratek

ADP	adenosine diphosphate	adenosindifosfát
AIP4	atrophin-1- interacting protein 4	atrofin-1 interakční protein 4
ARF	ADP ribosylation factor	ADP ribosylační faktor
ARL	ARF-like proteins	proteiny podobné ARF
ATP	adenosinetriphosphate	adenosintrifosfát
CARD	caspase recruitment domain	kaspázová asociační doména
c-Cbl	Casitas B-lineage lymfoma	lymfom Casitas rodové linie B
CTD	C-terminal regulatory domain	C-koncová regulační doména
DD	death domain	doména smrti
DDX5	DEAD-box polypeptid 5	DEAD-box polypeptid 5
DExD/H box	Asp-Glu-x-Asp/His – box	Asp-Glu-x-Asp/His – box
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	double-strand ribonucleic acid	dvouřetězcová ribonukleová kyselina
DUB	deubiquitinating enzyme	deubikvitinující enzym
EZH2	enhancer of zeste homolog 2	enhancer zeste homolog 2
FADD	Fas-associated death domain	fas-asociovaná doména smrti
FAT10	HLA-F adjacent transkript 10	transkript 10 přilehlý k HLA-F
GTP	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
HCV	hepatitis C virus	virus hepatitidy typu C
HEK293FT	human embryonic kidney 293 cell variant FT	varianta FT buněk lidských embryonálních ledvin 293
IFN	interferon	interferon
IRF	Interferon regulator transcription factors	Interferonové regulační transkripční faktory
IκB	NF-κB inhibitor	inhibitor NF-κB
IKK	IκB kinase	IκB kináza
IKK-γ	IκB kinase subunit gamma	podjednotka gamma IκB kinázy
IKKε	IκB kinase subunit ε	podjednotka epsilon IκB kinázy
LGP2	laboratory of genetics and physiology 2	
Lys <sup>377</sup>	lysine	lysin
MAVS	mitochondrial antiviral-signaling protein	antivirový signalizační protein na mitochondriích
MDA5	melanoma differentiation-associated gene 5	

MLL	mixed lineage leukemia	leukemické smíšené rody
NEMO	NF- $\kappa$ B essential modulator	NF- $\kappa$ B základní modulátor
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B	jaderný faktor kappa B
NLRX1	NOD-like receptor X1	receptor X1 podobný NOD
NOD	nucleotide binding oligomerization domain	nukleotid vázající oligomerizační doména
NS	nonstructural protein	nestrukturní protein
NTR	non-translated region	nepřekládaná oblast
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	molekulární vzory asociované s patogeny
PCBP2	poly(rC) binding protein 2	poly (rC) vazebný protein 2
PKC $\alpha$ / $\beta$ II	protein kinase C $\alpha$ / $\beta$ II	protein kináza C PKC $\alpha$ / $\beta$ II
PLK1	Polo-like kinase 1	kináza 1 podobná Polo
PPM1A	Protein phosphatase magnesium-dependent 1A	proteinfosfatáza hořečnatá 1
PRR	pattern recognition receptors	receptory rozpoznávající molekulární vzory
RD	repressor domain	represorová doména
RHA	RNA helicase A	RNA helikáza A
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I	
RIP1	receptor interacting protein kinase 1	receptor interagující protein kináza 1
RLRs	(RIG)-I-like receptors	receptory podobné RIG-I
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RNF	RING finger protein	RING finger protein
SF	super family	nadrodina
SMURF2	Smad ubiquitin regulatory factor 2	Smad ubikvitinový regulační faktor 2
ssRNA	single-strand ribonucleic acid	jednořetězcová ribonukleová kyselina
STING	stimulator of interferon gene	stimulátor interferonového genu
TANK	TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator	Aktivátor NF- $\kappa$ B asociovaný s členem rodiny TRAF
TBK1	TANK binding kinase 1	TANK vazebná kináza 1
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1 associated DEATH domain protein	protein domény smrti asociovaný s receptorem faktoru nekrózy typu 1
TRAF	TNF receptor associated factor	faktor spojený s receptorem TNF
TRIM	tripartite interaction motif	trojstranný interakční motiv
USP	ubiquitin-specific protease	ubikvitin-specifické proteázy

## Obsah

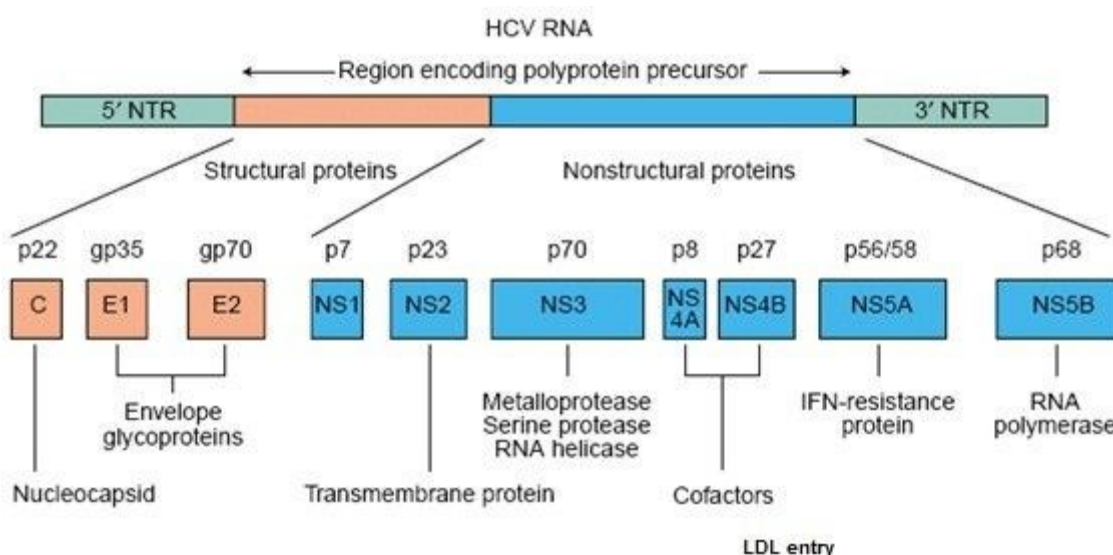
Abstrakt .....	iii
Seznam použitých zkratk .....	iv
Obsah.....	vi
1 Úvod a cíle práce .....	1
2 Struktura RNA helikáz.....	3
2.1 Hostitelem kódované helikázy .....	3
2.1.1 Helikázy indukující antivirovou odpověď .....	3
2.1.2 Helikázy indukující replikaci viru .....	5
2.2 Virem kódované helikázy .....	6
3 Mechanismus rozpoznání RNA viru pomocí RIG receptorů .....	8
3.1 RLR iniciovaná signální kaskáda.....	8
3.2 Regulátory RLR signalizace .....	13
3.2.1 LGP2.....	13
3.2.2 Negativní regulátory RIG-I .....	14
3.2.3 Negativní regulátory MDA5.....	16
3.2.4 Negativní regulátory MAVS .....	17
4 Obrana viru hepatitidy typu C proti imunitnímu systému hostitele .....	20
5 Závěr .....	21
6 Literatura .....	22

# 1 Úvod a cíle práce

Virus hepatitidy typu C (HCV) patří do rodu *Hepacivirus* z čeledi *Flaviviridae*, který dále zahrnuje například GB virus B a další viry (Boukadida et al., 2018). Jedná se o malý, pozitivní (*sense*), obalený virus, obsahující jednořetězcovou ribonukleovou kyselinu (ssRNA) replikující se primárně, ne-li pouze v hepatocytech (Zeisel et al., 2013).

Existence viru byla prvně uznána v roce 1975, kdy bylo zjištěno, že většina případů spojená s přenosem hepatitidy při krevních transfuzích nesouvisela s virem hepatitidy A ani B. Proto byla definována skupina takzvaných non-A, non-B hepatitid. Následné studie přenosu non-A non-B hepatitid u šimpanzů ukázaly, že infekci způsobuje malý obalený virový element. V roce 1989 byl genom HCV naklonován, osekvenován a následně byly díky vzorkům získaných z infikovaného šimpanze vyvinuty diagnostické testy umožňující detekci viru HCV. To vše umožnilo v základním výzkumu rozluštit komponenty velice komplexního životního cyklu tohoto významného patogenu (Bukh, 2016).

Genom HCV o velikosti 9,6kbp kóduje jediný polyprotein, který je po translaci zpracován virovými buněčnými proteázami za vzniku strukturních proteinů virionu a i nestrukturních (NS) proteinů, viz obrázek 1 (Lindenbach et al., 2005). Existuje sedm hlavních genotypů HCV, které se dále dělí mnoho podtypů (Nakano et al., 2012).



Obrázek 1: Organizace genomu viru hepatitidy typu C. Otevřený čtecí rámeček obsahuje polyproteinový precursor, složený z 3010 aminokyselin, ohraničený 5' a 3' nepřekládanou oblastí (NTR). Translace polyproteinu je řízena pomocí 5' NTR oblasti, která slouží jako vazebné místo pro ribozomy. Polyprotein je štěpen ko-translačně i post-translačně pomocí virových a buněčných proteáz na deset proteinových produktů, dělících se na strukturní a nestrukturní proteiny (Ashfaq et al., 2011).

Onemocnění HCV je značným problémem, o čemž informuje také Světová zdravotnická organizace ve své zprávě z roku 2017. V té se uvádí, že hlavní příčiny úmrtí na hepatitidu typu C v roce 2015 byly jaterní cirhóza a hepatocelulární karcinom. Ke stejnému roku se uvádí celosvětový odhad 71 milionů lidí s chronickou infekcí HCV (World Health Organization and World Health Organization, Global Hepatitis Programme). Diagnostika HCV doporučená Americkou asociací pro studium nemocí jater probíhá pomocí testování krve na přítomnost protilátek proti HCV nebo na přítomnost virové RNA (2015). Jedním ze současných cílů klinického výzkumu je vyvinutí vakcíny proti HCV, která zatím není k dispozici (Boukadida et al., 2018).

Vrozený imunitní systém je první obrannou linií a významným původcem vzniku akutního zánětu jako odpovědi vůči mikrobiální či virové infekci. Ke vzniku zánětu přispívají nejen dendritické buňky a makrofágy, ale i epiteliální, endoteliální buňky a fibroblasty. Zárodečnou linií kódované PRR (receptory rozpoznávající molekulární vzory), jež jsou na povrchu či uvnitř téměř všech buněk, zodpovídají za rozpoznání přítomnosti mikroorganismů, případně virů. K rozpoznání mikroorganismů a virů slouží druhově rozpoznatelné konzervované struktury zvané molekulární vzory asociované s patogeny (PAMPs). V současné době jsou rozděleny PRR do čtyř skupin zahrnujících transmembránové proteiny, jako jsou *toll like* receptory a receptory C-lektinového typu, ale také cytoplasmatické proteiny, jako například receptory podobné RIG (Retinoic acid-inducible gene) neboli RLR a receptory podobné NOD. V cytoplasmě lokalizované RLR rozeznávají genomovou RNA dvouřetězcových RNA (dsRNA) virů a dsRNA generovanou jako replikační intermediát ssRNA virů (Takeuchi and Akira, 2010).

Aktivace cytoplasmatických RLR receptorů spouští komplexní signální kaskádu vedoucí ve výsledku k přesunutí příslušných transkripčních faktorů do jádra, což vede k produkci interferonů typu I (IFN) a prozánětlivých cytokinů. Ty jsou klíčové jednak k vyvolání antivirové odpovědi v infikovaných i okolních buňkách, a také k formování adaptivní imunitní odpovědi (Lee et al., 2015).

Cílem této práce je formou rešerše shrnout dostupné informace o roli cytoplasmatických PRR v antivirové obraně při infekci eukaryotické buňky virem hepatitidy typu C se zaměřením na detailnější popis RIG-I, MDA5 a LGP2 drah.



## 2 Struktura RNA helikáz

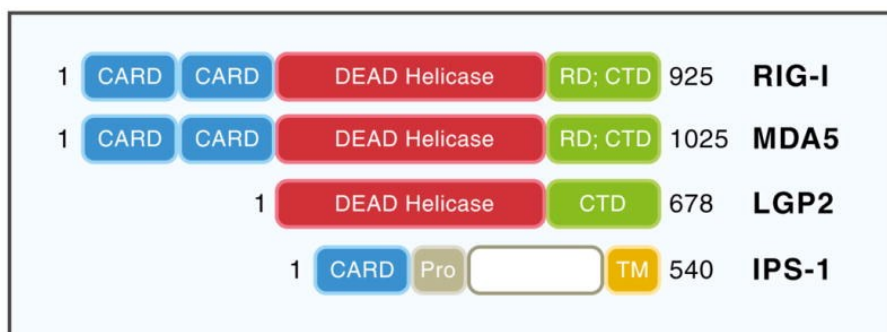
RNA helikázy, vyskytující se v bakteriálních a eukaryotních buňkách a i u virů, hrají klíčovou roli při reakci hostitele s virem. Role helikáz při infekci hostitelské buňky je velmi různorodá. Některé slouží jako nezbytné hostitelské komponenty pro replikaci viru. V jiných případech slouží jako buněčný senzor, který spouští imunitní odpověď v reakci na virovou infekci. Jednotlivý znak všech RNA helikáz je přítomnost vysoce konzervované adenosintrifosfát (ATP)-vazebné domény DExD/H (o sekvenci Asp-Glu-x-Asp/His). Jádro RNA helikáz je tvořeno osmi konzervovanými motivy označenými I, Ia, Ib, II, III, IV, V a VI. Společně s DNA helikázami mohou být RNA helikázy rozděleny do pěti nadrodin (SF1-SF5). Většina RNA helikáz spadá do nadrodiny SF2, která se dále dělí na jedenáct rodin, z nichž do pěti podrodin patří helikázy typu DExD/H. Konkrétně se jedná o buněčné helikázy DEAD box, SKI2-like DExH, RIG-I like DExH, DEAH/RHA a virovou helikázu DExH (Ranji and Boris-Lawrie, 2010).

### 2.1 Hostitelem kódované helikázy

Některé hostitelem kódované RNA helikázy, konkrétně helikázy typu RLR, se podílejí na indukci buněčné antivirové odpovědi u eukaryotních a bakteriálních buněk a inhibují replikaci virů, jiné helikázy kódované hostitelem ovšem replikaci virů naopak podporují. Do této druhé skupiny helikáz patří například helikázy DDX3, RHA a p68 (Ranji and Boris-Lawrie, 2010).

#### 2.1.1 Helikázy indukující antivirovou odpověď

RIG-I, MDA5 a LGP2 jsou helikázy indukující antivirovou odpověď. Jedná se o homology RLR sloužící jako cytoplazmatické PRR. RLR helikázy mají konzervovanou základní organizaci, kde je helikázové jádro tvořeno DExD/H boxem, který obsahuje místo pro vazbu a hydrolýzu ATP. Jedinečnost helikáz typu RLR je dána jejich vazebnými doménami, které zahrnují dvě kaspázové aktivační a vazebné domény (CARD) na N-konci, inzerční doménu v jádru helikázy a C-koncovou regulační doménu (CTD). Schematické strukturní znázornění RLR, konkrétně RIG-I, je zobrazeno na obrázku 2.

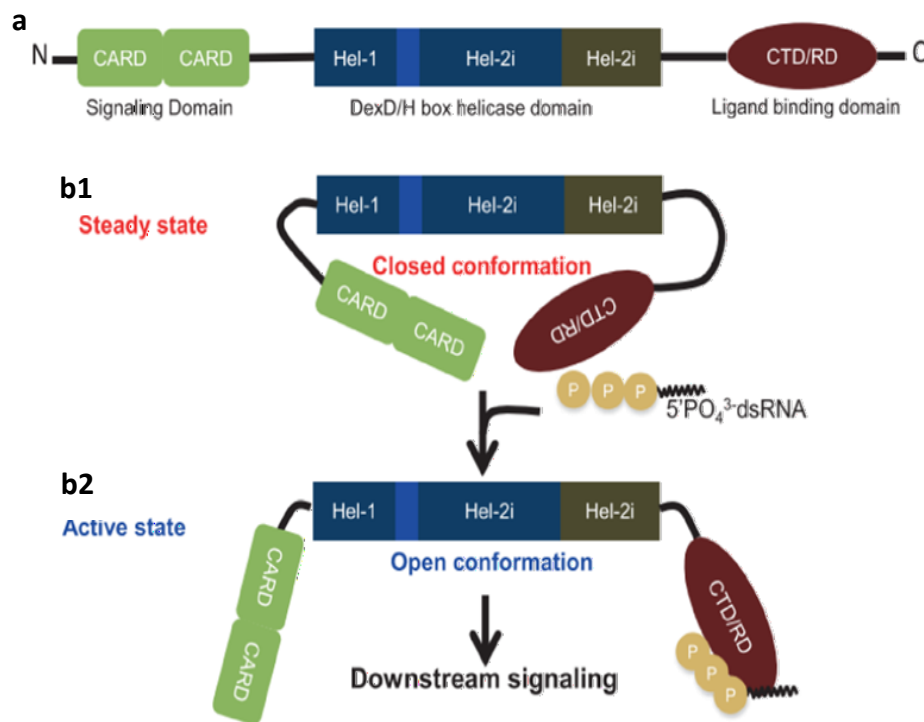


Obrázek 2: Zobrazení klíčových domén RLR zapojených do antivirové signalizace a adaptorového proteinu MAVS (mitochondriální antivirový signalizační protein; též známý jako IPS-1, VISA a Cardif). RLR se skládají za dvou CARD domén, ATPázy obsahující DEAD box a C-koncové domény (CTD). RIG-I a MDA5, obsahuje represorovou doménu (RD) sloužící k udržení helikázy v signalizačně neaktivním stavu, tedy k její autoregulaci. LGP2

postrádá N-koncové CARD domény. MAVS je adaptorový protein se kterým interagují RLR při antivirové signalizaci a skládá se z homologní CARD domény, oblasti bohaté na prolin a transmembránové domény (TM) (Loo and Gale, 2011).

V případě RIG-I jsou CARD domény odpovědné za přenos signálu na následné komponenty signální kaskády (v tomto textu označován jako *downstream*) (Luo et al., 2011). Jak RIG-I, tak MDA5 helikáza rozpoznávají dvouřetězcové molekuly RNA, přičemž každá z těchto dvou helikáz rozeznává dsRNA o jiné velikosti (Kato et al., 2008).

Regulační část RIG-I helikázy rozpoznává dvouřetězcové molekuly RNA s 5'-difosfátovou či trifosfátovou skupinou (Hornung et al., 2006). dsRNA delší než 300 párů bází však mohou stimulovat RIG-I helikázu nezávisle na počtu fosfátových skupin (Kato et al., 2008). Podle krystalové struktury RIG-I helikázy bylo prokázáno, že se tato helikáza bez navázané dsRNA molekuly jakožto ligandu vyskytuje v uzavřené konformaci. Po navázání dsRNA na CTD doménu dochází k přechodu helikázy do otevřené konformace, viz obrázek 3 (Cui et al., 2008). Bylo prokázáno, i díky dalším krystalografickým studiím, že vazba mezi CTD doménou RIG-I a dsRNA molekulou je zprostředkována elektrostatickými silami (Lu et al., 2010).



Obrázek 3: Schematické znázornění struktury RIG-I helikázy v uzavřené (b1) a otevřené (b2) konformaci v nepřítomnosti respektive přítomnosti ligandu. Zeleně jsou zobrazeny N-koncové kaspázové aktivační a vazebné domény, modře DExD/H helikázová doména a červeně C-koncová doména (CTD) (upraveno dle Abdullah and Atif 2017).

Navzdory tomu, že MDA5 helikáza sdílí s RIG-I helikázou na proteinové úrovni sekvenční podobnost a využívá stejné signální dráhy, obě rozeznávají jiné typy RNA molekul. Oproti RIG-I detekuje helikáza MDA5 delší dsRNA vyskytující se v genomu dsRNA virů nebo jakožto součást replikačních intermediátů virů s pozitivním řetězcem. Navíc je CTD doména MDA5 helikázy, v porovnání s RIG-I CTD doménou, lehce pootočená. Tento nevelký rozdíl v orientaci CTD mění prostorovou strukturu MDA5 z uzavřené na otevřenou, což umožňuje MDA5 helikáze se vázat na centrální část dsRNA, na rozdíl od prostorové struktury RIG-I helikázy, která díky orientaci své CTD váže 5' konec dsRNA (Wu et al., 2013). Přestože se MDA5 váže na dsRNA jako monomer, za určitých okolností dochází k interakci jednotlivých molekul MDA5 za vzniku vláknitého oligomeru podél rozpoznávané dsRNA molekuly (Peisley et al., 2011). Tvorba tohoto oligomerního vlákna koreluje s buněčnou signální aktivitou v důsledku odbourávání konců vláken vyvolaným hydrolyzou ATP (Peisley et al., 2012).

Helikáza LGP2 byla původně identifikovaná v nádorech mléčné žlázy jako vysoce exprimovaný protein. Na rozdíl od RIG-I a MDA5 helikáz nemá LGP2 CARD domény. Její role je v antagonizaci signalizace zprostředkované RIG-I a MDA5 vytvořením heterodimerních komplexů s těmito helikázami. Kromě toho může LGP2 interagovat s MAVS (mitochondriální antivirový signální protein; též známý jako IPS-1, VISA a Cardif) a tím ve výsledku blokovat produkci interferonů (Murali et al., 2008). CTD doména u LGP2 je svým složením podobná CTD doméně u RIG-I helikázy. Původně se LGP2 považovala pouze za negativní regulátor RIG-I helikázy, ovšem další studie ukázaly, že může fungovat i jako pozitivní regulátor (Takahasi et al., 2009). Jako pozitivní regulátor hraje zásadní roli v aktivaci IFN signalizace proti infekci HCV tím, že stimuluje schopnost MDA5 rozeznat HCV PAMPs (Hei and Zhong, 2017).

### 2.1.2 Helikázy indukující replikaci viru

Viry, jakožto vnitrobuněční parazité, využívají hostiteli kódované RNA helikázy k svojí vlastní replikaci. V současné době je popsáno osm takových RNA helikáz, nejen u RNA ale i u DNA virů, syntetizujících svůj genom v jádře hostitelské buňky (Ranji and Boris-Lawrie, 2010). Vzhledem k charakteru této práce, budou zmíněny pouze ty RNA helikázy, které jsou využívány virem hepatitidy typu C, konkrétně helikázy DDX3, RHA a p68.

DDX3 je cytoplazmatická DExD/H helikáza, která je exprimovaná ve velkém množství tkání (Ranji and Boris-Lawrie, 2010). DDX3 hraje roli v transkripci, sestřihu RNA a také exportu mediátorové RNA a její následné translaci. Byla také popsána role DDX3 v průběhu regulace buněčného cyklu, buněčného růstu a tumorigenezi. Kromě všeho výše zmíněného se DDX3 podílí na regulaci životního cyklu HCV (Tsai et al., 2017). Nejprve byla prokázána interakce mezi DDX3 helikázou a jaderným strukturním core proteinem HCV pomocí kvasinkových dvouhybridních systémů, následně byla po-

mocí RNA interference ověřena důležitost DDX3 pro replikaci virové RNA v jaterních buňkách HuH-7 (Ranji and Boris-Lawrie, 2010). Infekce buňky virem HCV vede k redistribuci helikázy DDX3 do míst syntézy HCV kolem tukových kapének a kolokalizuje s molekulou HCV. Specifické interakce mezi DDX3 a molekulou HCV a jejich funkční význam pro životní cyklus viru HCV zůstává nejasný (Ariumi, 2014).

RNA helikáza A (RHA), také označována jako DHX9 helikáza, nebo jako jaderná DNA helikáza II, patří do nadrodiny SF2. Tato helikáza rozplétá řetězce dsDNA, dsRNA a hybridní molekuly DNA-RNA v orientaci 3' -> 5'. O její specifitě, co se týče substrátu, je velmi málo známo. DHX9 byla poprvé identifikována jako genový produkt genu *maleless* u *Drosophila melanogaster*, kde je nezbytná pro kompenzaci dóze mezi dvěma chromozomy X samic a jedním chromozomem samců (Chakraborty and Grosse, 2011). Sekvenční analýza genu DHX9 odhalila centrální helikázovou doménu skládající se z 8 motivů. Centrální oblast helikázy je vysoce konzervovaná mezi různými živočišnými druhy, zatímco N- a C-koncové oblasti obvykle vykazují velkou variabilitu. I přesto že je výše popsána helikáza převážně jaderný protein, je schopna přesunu do cytoplazmy, kde hraje roli v regulaci translace, zpracování mikroRNA, či v inhibici transkripce a jaderného dělení (Lee and Pelletier 2016). V neposlední řadě bylo pozorováno, že přítomnost RHA helikázy je nezbytná k replikaci HCV, což bylo prokázáno při utlumení (*silencing*) této helikázy pomocí RNA interference načež došlo k postupnému útlumu replikace (He et al., 2008).

DEAD box polypeptid 5 (DDX5), také znám pod názvem p68, je členem velké rodiny ATP - dependentních RNA helikáz. DDX5 je helikáza účastnící se metabolismu RNA a to jak transkripce a translace, tak i degradace RNA molekul, a také syntézy mikroRNA (Cheng et al., 2018). Helikázové jádro DDX5 je tvořeno 9 motivy (Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V a VI), z nichž motiv Q umožňuje vazbu a hydrolyzu ATP, ale také ovlivňuje afinitu helikázy DDX5 k RNA substrátům a vlastní helikázovou aktivitu. Některé RNA viry, HCV nevyjímaje, využívají buněčnou DDX5 helikázu ve svém životním cyklu (Cordin et al., 2004). S využitím kvasinkových dvouhybridních systémů bylo prokázáno, že DDX5 interaguje s HCV NS5B RNA dependentní RNA polymerázou a tím urychluje replikaci HCV. Přestože HCV má vlastní RNA helikázu kódovanou proteinem NS3, p68 pomáhá s rozplétáním virové dsRNA, a tím zvyšuje efektivní rychlost u replikace HCV (Goh et al., 2004).

## 2.2 Virem kódované helikázy

Většina virů nekóduje vlastní helikázy, ale využívá helikázy hostitelské. Existují avšak tři rodiny virů kódující svojí vlastní helikázu. Do této skupiny virů patří právě HCV (kódující protein NS3), Vaccinia virus z rodiny Poxviridae a Plum pox virus z rodiny Potyviridae. Virové helikázy jsou nezbytné

pro replikaci těchto virů a jsou tedy vhodným cílem pro možnou antivirovou terapii (Ranji and Boris-Lawrie, 2010).

NS3 je u HCV multifunkční protein s proteázovou i helikázovou aktivitou. Tento protein obsahuje dvě domény, N-koncovou doménu obsahující serinovou proteázu a C-koncovou RNA helikázovou doménu (Kim et al., 1996). Protein NS3 ve vazbě s peptidem NS4a tvoří komplex hrající roli v štěpení HCV polyproteinu a replikaci HCV viru (Grakoui et al., 1993). RNA helikáza NS3 reguluje replikační cyklus HCV ve dvou bodech. Během replikace HCV viru je vyžadováno rozpletení dvouvláknové RNA, což umožňuje pohyb NS5b polymerázy (Piccininni et al., 2002). Helikáza NS3 také pomáhá při sestavování virových partikulí, což je pravděpodobně dáno její schopností tvořit protein-proteinové interakce (Ma et al., 2008). Výzkum léčby onemocnění způsobené virem HCV se zaměřuje na inhibitory klíčových NS proteinů potřebných pro replikaci, přičemž jedním z nejvíce studovaných je právě komplex NS3/NS4a (Meewan et al., 2019; Taylor et al., 2019).

### 3 Mechanismus rozpoznání RNA viru pomocí RIG receptorů

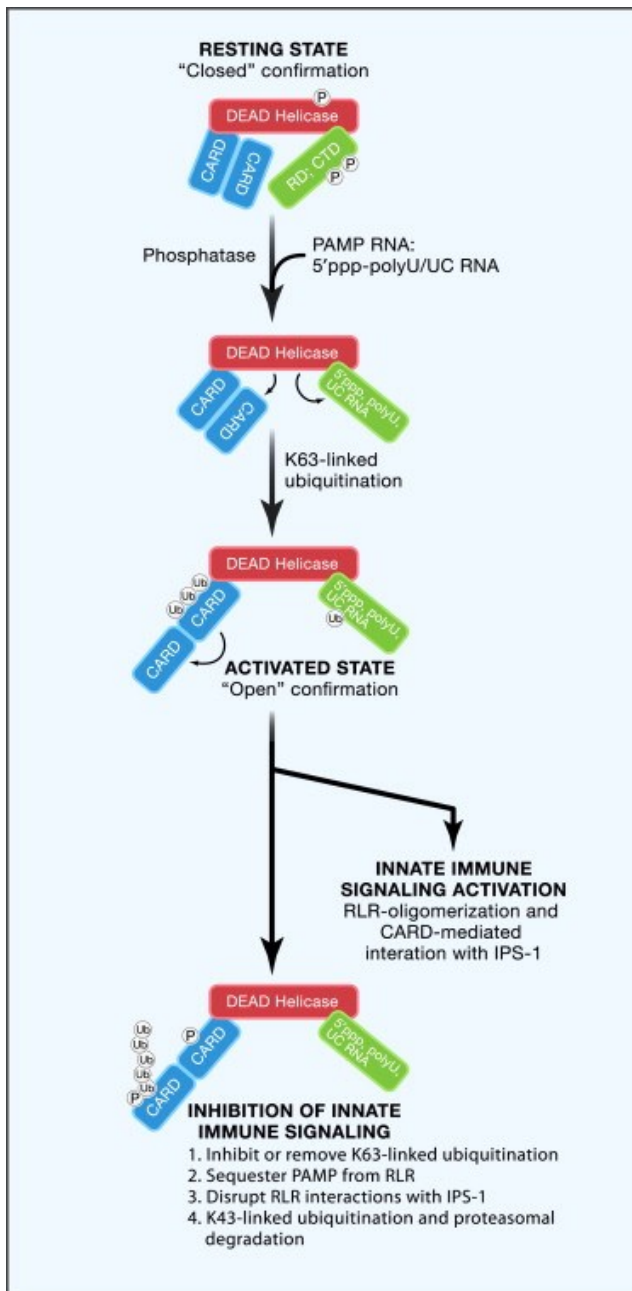
Jak již bylo výše zmíněno, receptory z rodiny RLR helikáz, tedy RIG-I a MDA5 jsou důležitými iniciátory vrozené imunitní odpovědi při infekci RNA virem. Svou roli, a to rozpoznávací, zde hraje i třetí člen této rodiny, LGP2 helikáza. Helikázy typu RLR jsou přítomny v cytoplasmě téměř každé eukaryotní a bakteriální buňky.

#### 3.1 RLR iniciovaná signální kaskáda

Helikázy RIG-I a MDA5 jsou v cytoplasmě obvykle udržovány v neaktivním stavu. To je částečně způsobeno autoregulační funkcí CTD domény obsahující regulační doménu (RD). Tato regulační doména interaguje s vlastní CARD doménou, čímž se zabrání předčasné interakci RLR s MAVS, což by ve výsledku spustilo nechtěnou kaskádovitou signalizaci a produkci IFN (Saito et al., 2007). Neaktivní stav helikázy RIG-I je také udržován díky fosforylaci CARD domén pomocí protein kinázy C  $\alpha/\beta$ II (PKC $\alpha/\beta$ II) (Maharaj et al., 2012). Po vstupu cizorodé dsRNA do cytoplazmy hostitelské buňky dojde k interakci této dsRNA s CTD doménou RLR receptorů. V případě krátkých dsRNA, či RNA s volným 5'-trifosfátovým koncem se zapojí do signalizace receptor RIG-I (Hornung et al., 2006). Ligandem pro MDA5 receptor jsou naopak dlouhé dsRNA molekuly (Wu et al., 2013). RNA virus hepatitidy typu C je detekován pomocí RIG-I, díky 5'-trifosfátovým koncům (Saito et al., 2008), tak i pomocí MDA5 helikázy, což je způsobeno pozitivní regulací MDA5 helikázou LGP2, viz kapitola 3.2.1 (Cao et al., 2015). Následkem interakce helikázy s dsRNA, dochází k posttranslační modifikaci helikázy spočívající v přerušení spojení mezi CARD a RD doménou. Toto přerušení je umožněno díky defosforylaci CARD domén pomocí protein fosfatázy 1 (Wies et al., 2013).

V přechodu od uzavřené k otevřené konformaci zaujímají důležitou roli také ubikvitin ligázy z rodiny TRIM (trojstranný interakční motiv). TRIM25 podporuje polyubikvitinaci helikázy typu K63 proximálně lokalizované CARD domény. U MDA5 podporuje TRIM65 polyubikvitinaci helikázové domény na pozici K63 (Lang et al., 2017). Při interakci dsRNA s MDA5 helikázou dochází k SUMOylaci MDA5 CTD domén pomocí E3 ligázy PIAS2 $\beta$ , což vede k spuštění antivirové signalizace zprostředkované MDA5. Bylo ukázáno, že nadměrná exprese PIAS2 $\beta$  vede ke zvýšení SUMOylace a tím i aktivity IFN promotoru v HEK293T buňkách, zatímco mutace v PIAS2 $\beta$  (C362S) aktivitu promotoru utlumuje (Fu et al., 2011). Další E3 ligázou podílející se na změně konformace helikázy RIG-I, po interakci s dsRNA, je ligáza Riplet, která ubikvitinuje lyzinové zbytky v CTD doméně RIG-I, což vede k rozvolnění autorepresované vazby mezi doménami RD a CARD (Hayman et al., 2019). Navázáním dsRNA na helikázu dochází tedy ke konformačním změnám a CARD domény jsou uvolněny od RD domény. Tato otevřená konformace získává signalizační aktivitu a CARD domény jsou schopny asociovat s adapto-

rovým proteinem MAVS (Loo and Gale, 2011). Grafické zachycení aktivace RIG-I receptoru je zobrazeno na obrázku 4.



Obrázek 4: Znárodnění aktivace RIG-I. Receptor se zprvu nachází v signalizačně neaktivní tzv. uzavřené konformaci. To je dáno částečně účinkem PKC $\alpha$ / $\beta$ II, částečně také díky autoregulačním interakcím vně molekuly, kde na sebe vzájemně působí CTD/RD a CARD domény. Během vstupu cizorodé dsRNA dochází k reorganizaci CTD domény, která interaguje se svým ligandem (dsRNA). Tím se spustí kaskáda posttranslačních modifikací, kterých se účastní protein fosfatáza 1, TRIM25 a Riplet, což v konečném důsledku vede k RIG-I signalizační aktivaci. Ta je dána schopností uvolněných CARD domén asociovat s adaptorovým proteinem MAVS (Loo and Gale, 2011).

Dále již signalizace zprostředkována helikázami RIG-I a MDA5 probíhá obdobně. Tedy po aktivaci se dotyčná RLR helikáza přemístí na mitochondriální membránu, kde interaguje s MAVS prostřednictvím vazby helikázové CARD domény s oblastí CARD domény lokalizované na MAVS proteinu (Seth et al., 2005). Důsledkem interakce mezi MAVS a RLR je polymerizace MAVS, což vede ke zvýšení afinity MAVS k adaptorovým proteinům TRAF (faktor spojený s receptorem TNF)

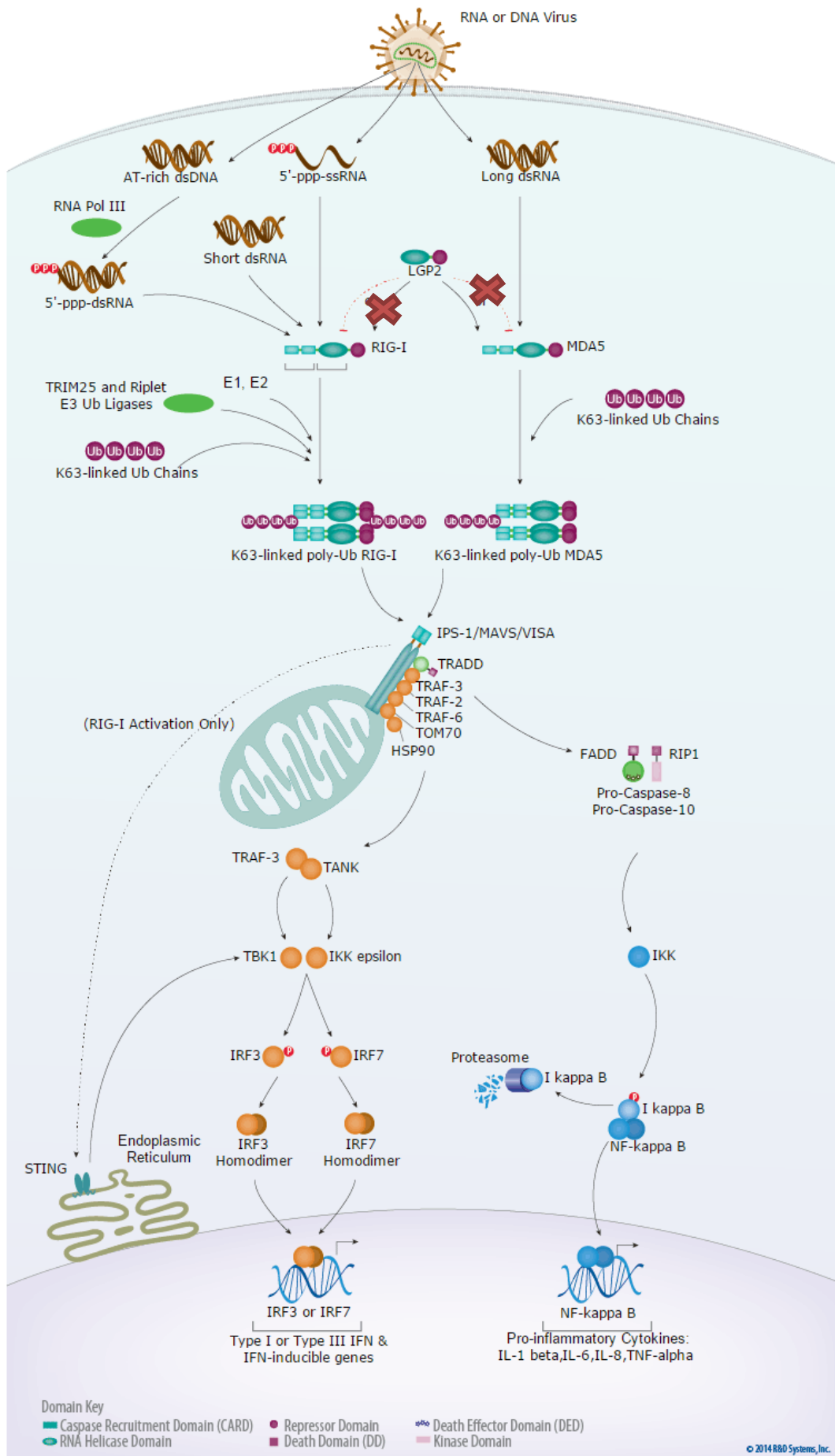
a k navázání těchto proteinů na MAVS. Navázání TRAF proteinů k polymerům MAVS vede k oligomerizaci TRAF, a ke spuštění ubikvitin ligázové aktivity těchto TRAF oligomerů. MAVS mají vazebné místo pro adaptorové proteiny TRAF2, TRAF3, TRAF5 a TRAF6, které jsou nezbytné pro aktivaci TBK1 (TANK vazebné kinázy 1) pomocí komplexu TRAF/MAVS ubikvitinací (Liu et al., 2013; Wang et al., 2012). Aktivační kaskáda začíná syntézou polyubikvitinačního řetězce TRAF ligázou. Tento řetězec přes TANK (aktivátor jaderného faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B) asociovaného s členy rodiny TRAF) interaguje s trimerním enzymovým komplexem IKK (I $\kappa$ B kináza), skládajícím se z podjednotek IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  a regulační podjednotky NEMO (NF- $\kappa$ B základní modulátor; též známý jako IKK $\gamma$ ). NEMO je hlavní pod-

jednotka, se kterou asociuje TANK. Asociace NEMO s TANK usnadňuje navázání TBK1 a IKK $\epsilon$  do mitochondriálního komplexu MAVS-TRAF a vede k aktivaci TBK1 a IKK $\epsilon$  (Zhao et al., 2007). Aktivovaný TBK1 a IKK $\epsilon$  fosforylují interferonové regulační transkripční faktory (IRF) 3 a IRF7 (Zhao et al., 2007). IRF7 i IRF3 homodimerizují a přemísťují se do jádra (Fitzgerald et al., 2003). Tím se vyvolává aktivace na interferon citlivého elementu, což při infekci HCV vede k zahájení exprese genů pro tvorbu IFN typu I a III a tím k navození antivirového stavu (Anggakusuma et al., 2015).

MAVS také interaguje s adaptorovým proteinem TRADD (s doménou smrti asociovaným s receptorem faktoru nekrózy typu 1). Ten asociuje s receptor interagující protein kinázou (RIP) 1 a společně navazují Fas-asociovanou doménou smrti (FADD), se kterou RIP1 tvoří komplex. TRADD také interaguje s rodinou proteinů TRAF (Michallet et al., 2008). Interakce MAVS s FADD a RIP1 proteiny probíhá prostřednictvím non-CARD oblasti helikáz MAVS (Kawai et al., 2005). FADD a RIP1 jsou proteiny obsahující doménu smrti (DD) (Chinnaiyan et al., 1996). RIP1 obsahuje, kromě již zmíněné DD lokalizované na C-konci, také N-koncovou kinázovou doménu a centrální doménu hrající roli v signalizaci. Zatímco vazba TRADD s FADD spouští apoptózu, vazba TRADD s FADD, TRAF a RIP1 aktivuje IKK komplex (Ea et al., 2006). Aktivace IKK probíhá pomocí ubikvitinace lysinu na pozici 377 (Lys<sup>377</sup>) na RIP1 (Li et al., 2006). IKK po své aktivaci fosforyluje NF- $\kappa$ B inhibitor (I $\kappa$ B), čímž spustí ubikvitin - proteazomální degradační dráhu tohoto inhibitoru. V průběhu této dráhy je I $\kappa$ B polyubikvitinován na Lys<sup>48</sup> a následně degradován proteazomem 26S (Krappmann and Scheidereit, 2005). Degradací I $\kappa$ B již nedochází k inhibici NF- $\kappa$ B, tím je tento transkripční faktor uvolněn a může vstoupit do jádra, kde řídí transkripci prozánětlivých cytokinů a několika antiapoptotických proteinů, které zabraňují buněčné smrti a podporují zánět (Ea et al., 2006; Wang et al., 2008). Celou výše popsanou signalizační dráhu znázorňuje obrázek 5 na následující stránce.

Nazmi se spolupracovníky jako první pozorovali, za využití viru japonské encefalitidy kterým infikovali neurony, že je pomocí RIG-I rozeznávána také ssRNA molekula. RIG-I se po vazbě ssRNA váže na transmembránový protein endoplazmatického retikula zvaný STING (stimulátor interferonového genu; také znám jako MPYS, ERIS, TMEM173 nebo MITA) a také MAVS, což vede k iniciaci signální kaskády ve výsledku vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B a IRF3, které se po vstupu cizorodé genetické informace ve formě RNA do buňky přesunují do jádra, váží na promotor IFN a tím ho aktivují (Nazmi et al., 2012).





Obrázek 5: Signalizační kaskáda receptorů podobným RIG. Vstupující cizorodá dsRNA působí jako ligand pro některý z RLR receptorů. V závislosti na délce dsRNA či přítomnosti 5'-trifosfátové skupiny je dsRNA rozpoznána MDA5 nebo RIG-I helikázou. Po interakci daného receptoru s molekulou RNA dojde k translokaci receptoru k membráně mitochondrií, kde následně dochází k interakci CARD domén receptorů a CARD domén na MAVS. Poté MAVS navazuje E3 ubikvitin ligázu TRAF. TRAF váže adaptorový protein TANK a ten asociuje s NEMO, což vede k navázání TBK1 a IKKε. Aktivace TBK1 a IKKε fosforyluje transkripční faktory IRF3 a IRF7, což má za následek transkripci interferonových genů. Dále MAVS interaguje s TRADD, navazuje FADD a RIP1, kteří spolu tvoří komplex aktivující IKK, což vede k aktivaci transkripčního faktoru NF-κB pro IL. Existuje také možnost RIG-I signalizace, která využívá interakce MAVS a STING. Tato signalizace též vede k aktivaci IRF3 a transkripci genů pro INF. Třetí člen RLR rodiny – LGP2 působí jako regulátor negativní i pozitivní v závislosti na tom, zda reguluje RIG-I nebo MDA5.

(upraveno dle <https://www.rndsystems.com/pathways/rig-i-like-receptor-signaling-pathways#print-copy-form>)

## 3.2 Regulátory RLR signalizace

Jako mnoho jiných signálních drah i RLR dráha je regulována různými negativními, ale i pozitivními regulátory, pomocí nichž zvyšuje efektivitu antivirové odpovědi, ale zároveň minimalizuje nežádoucí účinky. Všechny zde zmíněné regulátory jsou vyobrazeny na obrázku číslo 6 na straně 19.

### 3.2.1 LGP2

Cytoplazmatická DExD/H helikáza LGP2, rozpoznávající dsRNA, patří do rodiny RLR helikáz. Vykazuje strukturální homologii s ostatními členy rodiny RLR, ovšem na rozdíl od RIG-I a MDA5 helikáz nemá LGP2 helikáza CARD domény, potřebné přímé tvorbě komplexu s MAVS. Byla však popsána její schopnost regulovat RIG-I a MDA5 helikázy (Murali et al., 2008). LGP2 je schopna vázat řadu RNA ligandů, kupříkladu krátkou i dlouhou dsRNA nebo 5'-trifosfátovou ssRNA (Takahasi et al., 2009; Bruns et al., 2013).

Bylo prokázáno, že LGP2 zesiluje MDA5 signalizaci, tím že zvyšuje afinitu MDA5 ke stimulační dsRNA čímž zvyšuje antivirovou signalizaci. Zvýšení afinity je zapříčiněno kooperací LGP2 a MDA5. MDA5 má signalizační domény, ale k dsRNA se váže slabě. Naopak LGP2 rychle detekuje různé druhy dsRNA, ale postrádá signalizační domény. Oba receptory, LGP2 a MDA5, tedy spolupracují při detekci virové RNA a tvorbě antivirové odpovědi (Bruns et al., 2014). Přítomnost LGP2 mění kinetiku interakce MDA5-dsRNA a reguluje tvorbu MDA5 filament. LGP2 se vyznačuje vysokou afinitou k dsRNA a využívá hydrolýzu ATP k efektivnímu navázání různých substrátů na bázi dsRNA (Bruns et al., 2013). Díky vysoké afinitě LGP2 k dsRNA dochází k sestavení MDA5 filament na více pozicích, což vede k vytvoření většího množství filament MDA5 ve stejném čase. Všechna filamenta MDA5 podléhají rozkladu závislému na ATP, ale LGP2 umožňuje jejich rychlejší formování, stabilizuje tvorbu kratších filamentárních struktur MDA5 a umožňuje jejich hromadění se do vyššího množství, což má za následek jejich větší signalizační účinnost v průběhu času. Každé z krátkých MDA5 vláken obsahujících LGP2 helikázu je schopné indukovat aktivaci MAVS (Bruns et al., 2014).

V případě RIG-I plní helikáza LGP2 negativně regulační funkci tím, že blokuje ubikvitinaci RIG-I. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že LGP2 interaguje s E3 ubiquitin ligázou TRIM25, která posttranslačně modifikuje RIG-I, čímž pomocí ubikvitinace typu K63 CARD domén RIG-I helikázy přeměňuje RIG-I na signalizačně aktivní formu. Helikáza LGP2 inhibuje TRIM25-zprostředkovanou ubikvitinaci helikázy RIG-I, což vede k inhibici RIG-I v počáteční fázi antivirové imunitní signalizace. RNA vazebné a ATP hydrolytické schopnosti LGP2, stejně tak jako CTD část LGP2, jsou v tomto případě postradatelné pro výše uvedenou negativní regulaci RIG-I signalizace (Quicke et al., 2019).

### 3.2.2 Negativní regulátory RIG-I

Helikáza RIG-I je regulována mnoha negativními regulátory a právě těm jsou věnovány následující kapitoly.

#### 3.2.2.1 Ubikvitinace

Několik E3 ligáz je zapojeno do inhibice RIG-I signalizace po virové infekci. Mezi tyto ligázy patří RING finger protein (RNF) 125, RNF122, lymfom Casitas rodové linie B (c-Cbl), protoonkogen A20, a proteiny STUB1 a TRIM40.

RNF125 a RNF122 ubikvitinují N-koncové CARD domény RIG-I helikázy pomocí ubikvitinace typu K48, čímž směřují RIG-I helikázu do proteazomu, kde je degradována. To má za následek utlumení antivirové signalizace (Arimoto et al., 2007; Wang et al., 2016).

Protein c-Cbl je navázán na RIG-I helikázu lektinem Silec-G, a tyrosin fosfatázou SHP2. Doména CTD u RIG-I helikázy podléhá ubikvitinaci typu K48 v poloze Lys<sup>813</sup>. Ubikvitinace RIG-I na tomto místě vede k proteazomální degradaci. Celý proces je závislý na fosforylaci SHP2 a c-Cbl proteinu (Chen et al., 2013b).

Protein A20 má dvě ubiquitinové editační domény, N-koncovou de-ubikvitinační doménu a C-koncovou ubiquitin ligázovou doménu, která je složena ze sedmi zinkových *finger* domén. Delece N-koncové domény nemá žádný významný vliv na inhibiční účinek proteinu A20, zatímco delece C-koncové domény, konkrétně delece domény 7, má za následek ztrátu inhibičního účinku proteinu A20. Negativní regulační funkce proteinu A20 tedy závisí na její ubiquitin ligáze (Lin et al., 2006). Mérour s kolegy uvádějí, že protein A20 je schopen přerušit RIG-I signalizaci a úplně blokovat aktivaci IFN a ISG promotorů zprostředkovaných RIG-I signalizací (Mérour et al., 2019).

*Mixed lineage leukemia* (MLL) 5 patří do evolučně konzervované rodiny Trithoraxů, což je rodina proteinů majících za úkol regulaci genové exprese. MLL5 působí jako negativní regulátor v antivirových imunitních reakcích, kdy dochází k jeho translokaci z jádra do cytoplazmy a následnému zprostředkování interakce mezi RIG-I a E3 ubiquitin ligázou STUB1. Tato interakce vede k ubikvitinaci typu K48 a proteazomální degradaci RIG-I helikázy (Zhou et al., 2018).

E3 ligáza TRIM40 se váže na RIG-I a spouští polyubikvitinaci typu K27 a K48 prostřednictvím své E3 ligázové aktivity, což ve výsledku vede k degradaci RIG-I proteazomem (Zhao et al., 2017).

#### 3.2.2.2 De-ubikvitinace

Mechanismus negativní regulace RIG-I pomocí de-ubikvitinace spočívá v odstranění aktivujících K63-vázaných polyubikvitinových řetězců z helikázy RIG-I. Děje se tak pomocí de-ubikvitinačních enzymů (DUB), z nichž někteří zástupci ze skupiny ubiquitin-specifických proteáz (USP), negativně

regulují RLR signalizaci zacílením na K63 polyubikvitinové řetězce v oblasti N-koncových, pro aktivitu RLR nezbytných, CARD domén helikáz. Mezi tyto proteiny, které přímo inhibují RIG-I, patří USP3 (Inn et al., 2011), USP15 (Cui et al., 2014), USP17 (Chen et al., 2010), USP21 (Fan et al., 2014), USP25 (Zhong et al., 2013) a CYLD (Friedman et al., 2008).

### 3.2.2.3 Proteiny podobné ADP-ribosylačnímu faktoru

Arf-like proteiny (Arl) patří do rodiny vysoce konzervovaných GTPáz tzv. adenosindifosfát (ADP)-ribosylačních faktorů (Arf). Tyto proteiny hrají důležitou roli ve vezikulárním transportu, metabolismu lipidů, dynamice mikrotubulů a pravděpodobně dalších buněčných procesech (Li et al., 2004). Jeden z členů této rodiny, protein ARL16 interaguje s CTD doménou RIG-I helikázy a potlačuje její asociaci s dsRNA, čímž zamezuje přechodu RIG-I do aktivovaného stavu. Proteiny homologní s ARL16 např. ARL1 a ARF1, nejsou schopny inhibovat RIG-I-zprostředkovanou signalizaci (Yang et al., 2011).

### 3.2.2.4 Autofágní proteiny

Autofágie je evolučně konzervovaný způsob důležitý pro udržení buněčné homeostázy odstraněním nežádoucích proteinů a poškozených organel (Sun et al., 2016). Studie autofágních proteinů Atg5-Atg12 prokázaly, že jejich interakce negativně reguluje signalizační dráhu pro produkci IFN jejich přímou asociací s helikázami RIG-I a MAVS prostřednictvím jejich CARD domén. Konjugát Atg5-Atg12 nebrání interakci typu CARD-CARD mezi helikázami MAVS a RIG-I degradací helikáz, ale včleňuje se mezi MAVS a RIG-I a tím fyzicky inhibuje antivirovou signalizaci (Jounai et al., 2007).

### 3.2.2.5 Proteiny podobné NOD

Helikáza RIG-I a nukleotid vázající oligomerizační doména (NOD) 2 slouží jako klíčové faktory v detekci virových a bakteriálních patogenů a v následné iniciaci imunitní signalizace. Bylo prokázáno, že RIG-I a NOD2 nejen společně kolokalizují v buňce, ale také spolu přímo interagují. Tato interakce zůstává stabilní i v případě poškození aktinového cytoskeletu (Morosky et al., 2011). RIG-I negativně reguluje NOD2, který následně zpětnovazebně negativně reguluje RIG-I (Nie et al., 2017). NOD2 pravděpodobně působí jako negativní regulátor RIG-I signalizace tím, že svou interakcí s RIG-I helikázou maskuje CARD domény RIG-I helikázy (Morosky et al., 2011).

### 3.2.2.6 Další meziproteinové interakce

Jako jeden z negativních regulátorů RIG-I dráhy byl popsán malý, ubikvitinu podobný protein FAT10 (*HLA-F adjacent transkript 10*), který je znám jako signální protein pro degradaci zprostředkovanou proteazomem (Hipp et al., 2005). Nguyen s kolegy popsali mechanismus regulace, který zahrnuje vazbu FAT10 s E3 ligázou TRIM25 a s CARD doménami RIG-I helikázy. Vzniklý komplex FAT10-TRIM25-RIG-I brání navázání RIG-I helikázy na MAVS, čímž dochází k blokadě *downstream* signalizace.

Během této inhibice signalizačních schopností RIG-I helikázy nedochází k její degradaci proteazomem (Nguyen et al., 2016).

Dalším negativním regulátorem RIG-I je protein SEC14L1, člen rodiny SEC14. Ten interaguje s RIG-I N-koncovými CARD doménami, čímž kompetuje s MAVS o vazbu na RIG-I, což vede k inhibici RIG-I signalizace a zastavení přenosu signálu (Li et al., 2013).

### **3.2.3 Negativní regulátory MDA5**

Helikáza MDA5 je regulována mnoha negativními regulátory a právě těm jsou věnovány následující kapitoly.

#### **3.2.3.1 Ubikvitinace**

Protein RNF125 asociuje s MDA5 a pravděpodobně spouští ubikvitinaci typu K48, což vede k degradaci MDA5 proteazomem. Hladiny helikázy MDA5 v buňkách HEK293FT byly sníženy za nadprodukce proteinu RNF125, což naznačuje možnou degradaci MDA5 helikázy (Arimoto et al., 2007).

Dalším důležitým negativním regulátorem MDA5 je E3 ligáza TRIM40, která se váže na MDA5 a prostřednictvím své E3 ligázové aktivity spouští polyubikvitinaci typu K27 a K48. Takto označený protein je poté degradován proteazomem (Zhao et al., 2017).

#### **3.2.3.2 De-ubikvitinace**

Jak již uvedeno výše (kapitola 3.2.2.2), mechanismus regulace pomocí de-ubikvitinace tkví v odstranění aktivujících K63-vázaných polyubikvitinových řetězců pomocí DUB enzymů. Hlavní roli hraje protein USP3, který negativně reguluje MDA5 zprostředkovanou signalizaci zacílením na K63-polyubikvitinové řetězce v oblasti CARD domén helikázy MDA5 (Cui et al., 2014).

#### **3.2.3.3 Proteiny podobné ARF**

Podobně jako ARL16, který interaguje s RIG-I CTD, čímž potlačuje asociaci mezi RIG-I a RNA, se protein ARL5B váže k MDA5, čímž zabraňuje jeho interakci s RNA ligandem. Tato vazba není závislá na GTPázové aktivitě proteinu ARL5B, avšak vyžaduje vazbu tohoto proteinu k CTD doméně MDA5 helikázy (Kitai et al., 2015).

#### **3.2.3.4 Další meziproteinové interakce**

Narayan a jeho kolegové uvádějí, že TRIM13 negativně reguluje MDA5, avšak mechanismus zatím není zcela objasněn. Kupříkladu není jasné, zda je pro interakci MDA5 helikázy a TRIM13 vyžadována ligázová aktivita ubikvitin ligázy TRIM13. Ve stejné práci je také naznačeno, že ligáza TRIM59 taktéž negativně reguluje signalizaci MDA5 (Narayan et al., 2014). Výsledky jsou však spekulativní, neboť novější články již nepojednávají o TRIM59 v souvislosti s regulací MDA5 či RLR signalizace.

### 3.2.4 Negativní regulátory MAVS

Jako helikázy RIG-I a MDA5 je i jejich adaptorový protein MAVS negativně regulován mnoha regulátory, o nichž pojednávají následující kapitoly.

#### 3.2.4.1 Ubikvitinace

Mezi hlavní proteiny, podílející se na inhibici signalizace RLR po virové infekci zacílením na MAVS, patří E3 ubikvitin ligázy, jako například RNF125, MARCH5 (též známé jako MITOL, či RNF153), Smad ubikvitinový regulační faktor 2 (SMURF2) a atrofin-1 interakční protein 4 (AIP4).

Bylo popsáno, že ubikvitinace MAVS pomocí RNF125 má za následek významné snížení počtu buněk HEK293 přítomných v buněčných kulturách, což může naznačovat ubikvitinaci typu K48 následovanou degradací modifikovaných MAVS proteazomem (Arimoto et al., 2007). Ubikvitin ligázy SMURF2, MARCH5 a AIP4 též inhibují signalizaci MAVS pomocí ubikvitinace typu K48 což vede k jeho následné degradaci proteazomem (Pan et al., 2014; Yoo et al., 2015; You et al., 2009). MARCH5 interaguje pomocí své RING domény s CARD doménami MAVS, a ubikvitinuje Lys<sup>7</sup> a Lys<sup>500</sup> na MAVS, AIP4 asociuje s MAVS prostřednictvím adaptéru PCBP2 [poly(rC)-vazebného proteinu 2], čímž spouští ubikvitinaci typu K48. Takto modifikovaný MAVS je určen k degradaci proteazomem (Yoo et al., 2015; You et al., 2009).

#### 3.2.4.2 Autofágny proteiny

Již dříve zmíněný (kapitola 3.2.2.4) oligomer Atg5-Atg12 negativně reguluje signalizaci přímou asociací s RIG-I a MAVS prostřednictvím CARD domén tím, že se fyzicky včleňuje mezi MAVS a RIG-I (Jounai et al., 2007). Mimoto, s autofágny proteiny Atg5 – Atg12 interaguje mitochondriální elongační translační faktor Tu a protein Atg16L1, což ve výsledku vede k autofagii MAVS a tím k negativní regulaci exprese IFN (Lei et al., 2012).

#### 3.2.4.3 Proteiny podobné NOD

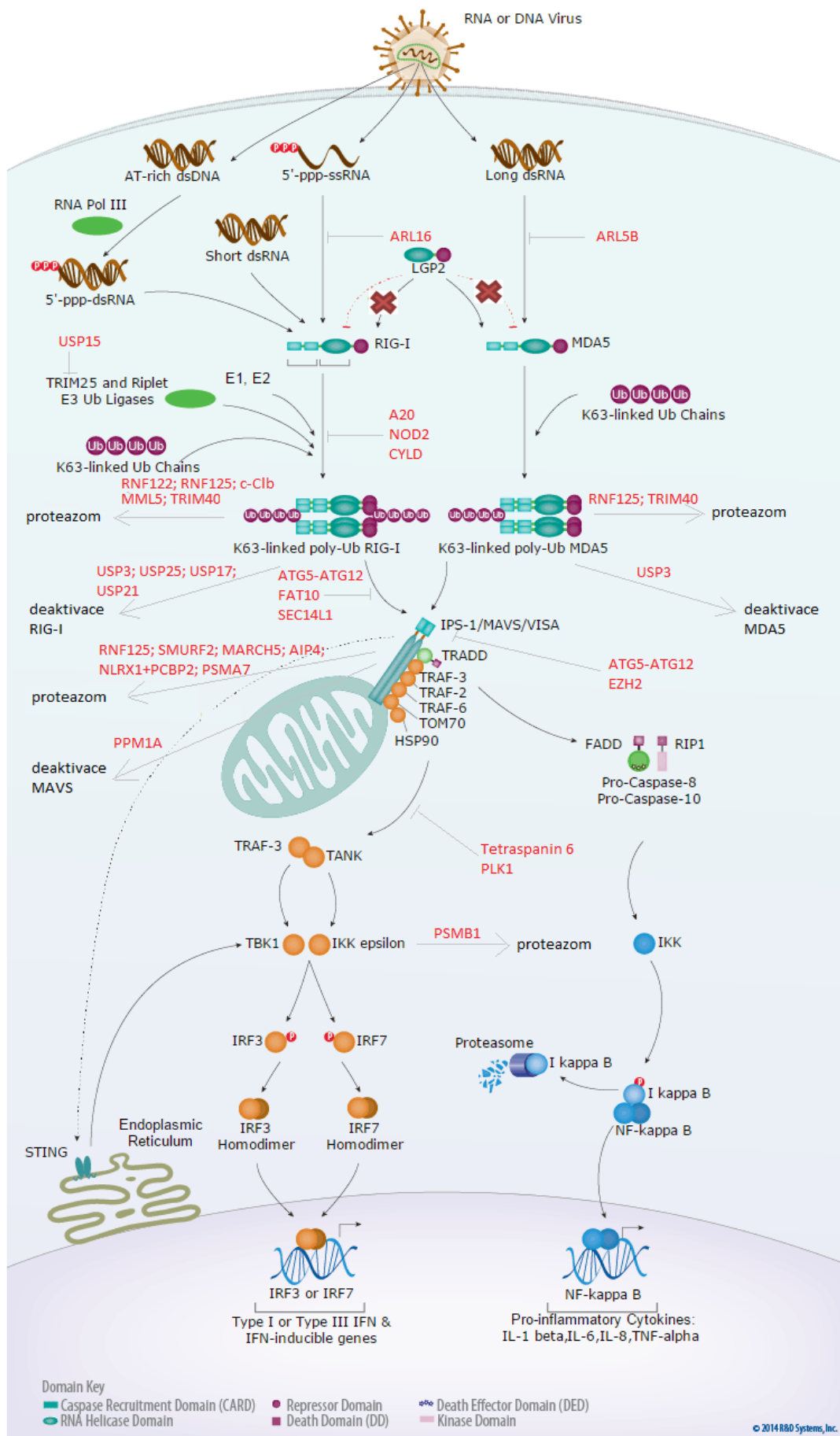
NOD-like receptor X1, zkráceně NLRX1 (též známý jako NOD5, NOD9 nebo NOD26) je členem rodiny NLR (Qin et al., 2017). Moore a kolegové zjistili, že na oligonuleotid vázající se doména NLRX1, interaguje s CARD doménou MAVS proteinu během virové infekce, čímž inhibuje RLR signalizaci (Moore et al., 2008)

Funkce NLRX1 jako negativního regulátoru přirozené imunitní odpovědi, byla nedávno potvrzena prací, ve které jako model sloužil virus hepatitidy C. Bylo prokázáno, že represe NLRX1 je indukována infekcí HCV, po níž se protein NLRX1 váže s PCBP2 a společně interagují s MAVS helikázou, což ve výsledku vede k polyubikvitinaci typu K48 a následné proteazomální degradaci MAVS (Qin et al., 2017).

#### 3.2.4.4 Další meziproteinové interakce

I v případě negativní regulace MAVS hrají roli různé další meziproteinové interakce nespadající do výše uvedených kategorií. První z příkladů je interakce MAVS s EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*), což je histon-methyltransferáza negativně regulující RLR signalizaci, ovšem nezávisle na své methyltransferázové aktivitě. EZH2 interaguje přímo s CARD doménami MAVS, čímž brání jejich interakci s helikázami typu RLR (Chen et al., 2013a). Další z příkladů negativní regulace je protein Tetraspanin 6, který asociuje s MAVS a ovlivňuje tvorbu signalosomu MAVS, tedy vytvoření signalizačního proteinového komplexu, a tím brání přenosu signálu (Wang et al., 2012b). Dalším negativním regulátorem MAVS proteinu je PLK1 (Polo-like kináza 1). PLK1 interaguje s MAVS na N- a na C-konci. Zatímco vazba na N-konci je podmíněna fosforylační aktivitou MAVS, vazba na C-konci je na této fosforylační aktivitě nezávislá. Právě vazba PLK1 na C-konci MAVS brání interakci TRAF3 a MAVS, což vede k inhibici aktivace IRF-3, která je zprostředkována právě pomocí TRAF3 ligázy (Vitour et al., 2009). Hořčnatá proteinfosfatáza 1A (PPM1A; také označovaná jako PP2Ca), což je Ser/Thr fosfatáza, je dalším příkladem negativního regulátoru MAVS. PPM1A totiž defosforyluje MAVS, což vede k rozrušení signálního komplexu MAVS-TBK1 a tedy k negativní regulaci MAVS (Xiang et al., 2016). Jedné z posledních zde zmíněných meziproteinových interakcí se účastní proteazomální podjednotka PSMA7, která negativně reguluje RLR signalizaci interakcí s MAVS tím, že spouští její degradaci proteazomem (Jia et al., 2009). PSMA7 váže proteiny pro proteazomální degradaci (Cho et al., 2001). Ačkoli proteazomální podjednotka PSMB1 není negativním regulátorem MAVS, ale negativním regulátorem *downstream* lokalizované molekuly IKK- $\epsilon$ , je zde mezi tyto regulátory řazena, neboť svou interakcí s IKK- $\epsilon$  spouští proteazomální degradaci IKK- $\epsilon$ , což v konečném důsledku znamená snížení produkce cytokinů a tedy negativní regulaci antivirové signalizace (Wu et al., 2019).





Obrázek 6: RLR signálační dráha s červeně vyznačenými negativními regulátory (upraveno dle <https://www.rndsystems.com/pathways/rig-i-like-receptor-signaling-pathways#print-copy-form>)

## 4 Obrana viru hepatitidy typu C proti imunitnímu systému hostitele

Virus hepatitidy C si vyvinul různé mechanismy obrany vůči buněčné imunitní odpovědi. Důkazem je virem kódovaná serinová proteáza NS3/NS4A, která je nejen nezbytná pro replikaci a sestavení viru HCV, ale je také klíčovým faktorem, díky němuž se HCV dokáže účinně bránit proti antivirové odpovědi hostitele (Ferreira et al., 2016). Cílem NS3/NS4A je mitochondriální antivirový signální protein MAVS, který aktivuje transkripční faktory regulující tvorbu IFN a cytokinů. NS3/NS4A štěpí MAVS na pozici Cys<sup>508</sup>, což vede k uvolnění N-koncového fragmentu MAVS z mitochondrie (Li et al., 2005). Rozštěpením MAVS dochází k inhibici exprese genů pro IFN prostřednictvím dráhy RIG-I. NS3 proteáza je tedy logickým cílem pro antivirovou léčbu, protože její inhibice nejen že narušuje zpracování polyproteinu, ale také obnovuje antivirovou signalizaci (McGivern et al., 2015).

V průběhu posledního desetiletí bylo vynaloženo značné úsilí k pochopení životního cyklu HCV, což vedlo k vývoji molekulárních inhibitorů zaměřených na specifické virové proteiny, jako jsou NS3 proteáza a NS5B RNA-dependentní RNA polymerázy (Scheel and Rice, 2013). Některé z těchto přímých antivirových léků se již využívají v léčbě a další léky jsou v klinickém vývoji (McGivern et al., 2015).

První inhibitory proteázy NS3/NS4A HCV viru, boceprevir a telaprevir, byly uvedeny na trh v roce 2011. Tyto inhibitory byly předepisovány pacientům infikovaných virem hepatitidy typu C genotypu 1 spolu s pegylovaným interferonem alfa a ribavirinem. Druhá generace inhibitoru NS3/NS4a HCV proteázy, simeprevir a nukleosidový analog NS5B polymerázového inhibitoru sofosbuvir, byla uvedena na trh v roce 2013. Poté následovali další sloučeniny asunaprevir, danoprevir, simeprevir, paritaprevir, vaniprevir a grazoprevir, které byly schváleny v kombinaci s inhibitorem NS5A interferonové resistance nebo inhibitorem polymerázy NS5B. Vyvíjené inhibitory proteázy NS3/NS4a cílí na kmeny HCV resistantní vůči dosavadním lékům, dále mají za cíl být méně toxické pro hepatocyty. Mezi takovéto látky patří například Vosevi (Meewan et al., 2019; Taylor et al., 2019).

## 5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo popsat a charakterizovat roli cytoplazmatických PRR účastnících se antivirové obrany při infekci eukaryotické buňky virem hepatitidy C. Tímto virem je celosvětově nakaženo přibližně 71 milionů lidí, přičemž hlavní příčinou úmrtí spojenou s infekcí virem HCV je jaterní cirhóza. Ačkoli proti nákaze virem HCV existuje léčba, dosud není imunizační vakcína proti tomuto viru.

HCV jakožto malý obalený ssRNA virus, který kóduje polyprotein, jehož součástí je i virová RNA helikáza, je detekován imunitním systémem hostitelské buňky pomocí receptorů rozpoznávající molekulární vzory ze skupiny RLR, které jsou součástí vrozeného imunitního systému. Do skupiny RLR patří cytoplazmatické receptorové helikázy RIG-I, MDA5 a LGP2. Imunitní systém tedy rozpozná vstupující cizorodou ribonukleovou kyselinu a pomocí cytoplazmatických receptorových helikáz se na ni naváže. Vazba způsobí posttranslační modifikace samotných receptorů a tím je uvede do signalizačně aktivního stádia. V tomto stádiu se receptory, pomocí svých N-koncových domén, váží k odpovídající doméně svého adaptorového proteinu, který je lokalizován na mitochondriích. Vazba mezi doménami adaptorového proteinu a receptoru spouští signální kaskádu, jejímž výsledkem je aktivace transkripčních faktorů regulujících expresi genů pro interferony a prozánětlivé cytokiny. Celý proces imunitní signalizace je přísně regulován pomocí pozitivních i negativních regulátorů.

Virem hepatitidy C kódovaná RNA helikáza NS3 interaguje s kofaktorem NS4a, s nímž tvoří NS3/NS4a komplex. Tento komplex vykazuje aktivitu serinové proteázy a slouží viru jako obrana proti imunitnímu systému hostitele. Pomocí této proteázy dochází k blokaci receptorového adaptorového proteinu, čímž není umožněno signalizačně aktivním receptorům se navázat na adaptorový protein a spustit tak signalizaci. Helikáza NS3 je též důležitá pro životní cyklus viru hepatitidy C. Duální vlastnost NS3 je důvodem intenzivního výzkumu, v oblasti inhibice zmíněné helikázy, dávající vzniknout léku proti viru hepatitidy C.

V posledních letech se na trh dostalo množství léků proti tomuto viru. Dle mého názoru je pro design a tvorbu funkční vakcíny nutné pochopit kompletní a detailní průběh RLR mediované signalizační kaskády, na úrovni struktury molekul a jejich interakcí. Dále je nutné lépe pochopit interakce této signalizační dráhy s dalšími imunitními signálními drahami a životním cyklem viru HCV.

## 6 Literatura

Přehledové články jsou označeny hvězdičkou \*

\*Abdullah, N., and Atif, S.M. (2017). RIG-I (Retinoic Acid Inducible Gene-I). In *Encyclopedia of Signaling Molecules*, (New York, NY: Springer New York), pp. 1–8.

Anggakusuma, Frentzen, A., Gürlevik, E., Yuan, Q., Steinmann, E., Ott, M., Staeheli, P., Schmid-Burgk, J., Schmidt, T., Hornung, V., et al. (2015). Control of Hepatitis C Virus Replication in Mouse Liver-Derived Cells by MAVS-Dependent Production of Type I and Type III Interferons. *J. Virol.* 89, 3833–3845.

Arimoto, K.I., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T., and Shimotohno, K. (2007). Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7500–7505.

\*Ariumi, Y. (2014). Multiple functions of DDX3 RNA helicase in gene regulation, tumorigenesis, and viral infection. *Front. Genet.* 5, 423.

\*Ashfaq, U.A., Javed, T., Rehman, S., Nawaz, Z., and Riazuddin, S. (2011). An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol. J.* 8, 161.

Boukadida, C., Fritz, M., Blumen, B., Fogeron, M.-L., Penin, F., and Martin, A. (2018). NS2 proteases from hepatitis C virus and related hepaciviruses share composite active sites and previously unrecognized intrinsic proteolytic activities. *PLOS Pathog.* 14, e1006863.

Bruns, A.M., Pollpeter, D., Hadizadeh, N., Myong, S., Marko, J.F., and Horvath, C.M. (2013). ATP hydrolysis enhances RNA recognition and antiviral signal transduction by the innate immune sensor, laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). *J. Biol. Chem.* 288, 938–946.

Bruns, A.M., Leser, G.P., Lamb, R.A., and Horvath, C.M. (2014). The Innate Immune Sensor LGP2 Activates Antiviral Signaling by Regulating MDA5-RNA Interaction and Filament Assembly. *Mol. Cell* 55, 771–781.

\*Bukh, J. (2016). The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J. Hepatol.* 65, S2–S21.

Cao, X., Ding, Q., Lu, J., Tao, W., Huang, B., Zhao, Y., Niu, J., Liu, Y.-J., and Zhong, J. (2015). MDA5 plays a critical role in interferon response during hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 62, 771–778.

Chakraborty, P., and Grosse, F. (2011). Human DHX9 helicase preferentially unwinds RNA-containing displacement loops (R-loops) and G-quadruplexes. *DNA Repair (Amst).* 10, 654–665.

Chen, R., Zhang, L., Zhong, B., Tan, B., Liu, Y., and Shu, H.B. (2010). The ubiquitin-specific protease 17 is involved in virus-triggered type I IFN signaling. *Cell Res.* 20, 802–811.

Chen, S., Sheng, C., Liu, D., Yao, C., Gao, S., Song, L., Jiang, W., Li, J., and Huang, W. (2013a). Enhancer of Zeste Homolog 2 Is a Negative Regulator of Mitochondria-Mediated Innate Immune Responses. *J. Immunol.* 191, 2614–2623.

Chen, W., Han, C., Xie, B., Hu, X., Yu, Q., Shi, L., Wang, Q., Li, D., Wang, J., Zheng, P., et al. (2013b). Induction of siglec-G by RNA viruses inhibits the innate immune response by promoting RIG-I degradation. *Cell* 152, 467–478.

\*Cheng, W., Chen, G., Jia, H., He, X., and Jing, Z. (2018). DDX5 RNA helicases: Emerging roles in viral infection. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1022.

Chinnaiyan, A.M., Tepper, C.G., Seldin, M.F., O'Rourke, K., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 4961–4965.

Cho, S., Choi, Y.J., Kim, J.M., Jeong, S.T., Kim, J.H., Kim, S.H., and Ryu, S.E. (2001). Binding and regulation of HIF-1alpha by a subunit of the proteasome complex, PSMA7. *FEBS Lett.* 498, 62–66.

Cordin, O., Tanner, N.K., Doère, M., Linder, P., and Banroques, J. (2004). The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity. *EMBO J.* 23, 2478–2487.

Cui, J., Song, Y., Li, Y., Zhu, Q., Tan, P., Qin, Y., Wang, H.Y., and Wang, R.F. (2014). USP3 inhibits type I interferon signaling by deubiquitinating RIG-I-like receptors. *Cell Res.* 24, 400–416.

Cui, S., Eisenächer, K., Kirchhofer, A., Brzózka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K.K., Krug, A., and Hopfner, K.P. (2008). The C-Terminal Regulatory Domain Is the RNA 5'-Triphosphate Sensor of RIG-I. *Mol. Cell* 29, 169–179.

Ea, C.K., Deng, L., Xia, Z.P., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2006). Activation of IKK by TNF $\alpha$  Requires Site-Specific Ubiquitination of RIP1 and Polyubiquitin Binding by NEMO. *Mol. Cell* 22, 245–257.

Fan, Y., Mao, R., Yu, Y., Liu, S., Shi, Z., Cheng, J., Zhang, H., An, L., Zhao, Y., Xu, X., et al. (2014). USP21 negatively regulates antiviral response by acting as a RIG-I deubiquitinase. *J. Exp. Med.* 211, 313–328.

Ferreira, A.R., Magalhães, A.C., Camões, F., Gouveia, A., Vieira, M., Kagan, J.C., and Ribeiro, D. (2016). Hepatitis C virus NS3-4A inhibits the peroxisomal MAVS-dependent antiviral signalling response. *J. Cell. Mol. Med.* 20, 750–757.

Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., and Maniatis, T. (2003). IKKE and TBK1 are essential components of the IRF3 signalling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 491–496.

Friedman, C.S., O'Donnell, M.A., Legarda-Addison, D., Ng, A., Cárdenas, W.B., Yount, J.S., Moran, T.M., Basler, C.F., Komuro, A., Horvath, C.M., et al. (2008). The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO Rep.* 9, 930–936.

Fu, J., Xiong, Y., Xu, Y., Cheng, G., and Tang, H. (2011). MDA5 is SUMOylated by PIAS2 $\beta$  in the upregulation of Type I interferon signaling. *Mol. Immunol.* 48, 415–422.

Goh, P. Y., Tan, Y. J., Lim, S.P., Tan, Y.H., Lim, S.G., Fuller-Pace, F., and Hong, W. (2004). Cellular RNA Helicase p68 Relocalization and Interaction with the Hepatitis C Virus (HCV) NS5B Protein and the Potential Role of p68 in HCV RNA Replication. *J. Virol.* 78, 5288–5298.

Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1993). Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J. Virol.* 67, 2832–2843.

Hayman, T.J., Hsu, A.C., Kolesnik, T.B., Dagley, L.F., Willemsen, J., Tate, M.D., Baker, P.J., Kershaw, N.J., Kedzierski, L., Webb, A.I., et al. (2019). RIPLET, and not TRIM25, is required for endogenous RIG-I-dependent antiviral responses. *Immunol. Cell Biol.* 97, 840–852.

He, Q.S., Tang, H., Zhang, J., Truong, K., Wong-Staal, F., and Zhou, D. (2008). Comparisons of RNAi approaches for validation of human RNA helicase A as an essential factor in hepatitis C virus replication. *J. Virol. Methods* 154, 216–219.

Hei, L., and Zhong, J. (2017). Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) plays an essential role in hepatitis C virus infection-induced interferon responses. *Hepatology* 65, 1478–1491.

Hipp, M.S., Kalveram, B., Raasi, S., Groettrup, M., and Schmidtke, G. (2005). FAT10, a ubiquitin-independent signal for proteasomal degradation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3483–3491.

Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., et al. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994–997.

Inn, K.S., Gack, M.U., Tokunaga, F., Shi, M., Wong, L.Y., Iwai, K., and Jung, J.U. (2011). Linear Ubiquitin Assembly Complex Negatively Regulates RIG-I- and TRIM25-Mediated Type I Interferon Induction. *Mol. Cell* 41, 354–365.

Jia, Y., Song, T., Wei, C., Ni, C., Zheng, Z., Xu, Q., Ma, H., Li, L., Zhang, Y., He, X., et al. (2009). Negative Regulation of MAVS-Mediated Innate Immune Response by PSMA7. *J. Immunol.* 183, 4241–4248.

Jounai, N., Takeshita, F., Kobiyama, K., Sawano, A., Miyawaki, A., Xin, K.Q., Ishii, K.J., Kawai, T., Akira, S., Suzuki, K., et al. (2007). The Atg5-Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14050–14055.

Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* 205, 1601–1610.

Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* 6, 981–988.

Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M.D., Landro, J.A., Chambers, S.P., Markland, W., Lepre, C.A., O'Malley, E.T., et al. (1996). Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87, 343–355.

Kitai, Y., Takeuchi, O., Kawasaki, T., Ori, D., Sueyoshi, T., Murase, M., Akira, S., and Kawai, T. (2015). Negative regulation of melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)-dependent antiviral innate immune responses by arf-like protein 5B. *J. Biol. Chem.* 290, 1269–1280.

\*Krappmann, D., and Scheidereit, C. (2005). A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of I $\kappa$ B kinase pathways. *EMBO Rep.* 6, 321–326.

Lang, X., Tang, T., Jin, T., Ding, C., Zhou, R., and Jiang, W. (2017). TRIM65-catalized ubiquitination is essential for MDA5-mediated antiviral innate immunity. *J. Exp. Med.* 214, 459–473.

\*Lee, T., and Pelletier, J. (2016). The biology of DHX9 and its potential as a therapeutic target. *Oncotarget* 7, 42716–42739.

Lee, R. van der, Feng, Q., Langereis, M.A., Horst, R. ter, Szklarczyk, R., Netea, M.G., Andeweg, A.C., Kuppeveld, F.J.M. van, and Huynen, M.A. (2015). Integrative Genomics-Based Discovery of Novel Regulators of the Innate Antiviral Response. *PLoS Comput. Biol.* 11, e1004553.

- Lei, Y., Wen, H., Yu, Y., Taxman, D.J., Zhang, L., Widman, D.G., Swanson, K. V., Wen, K.W., Damania, B., Moore, C.B., et al. (2012). The Mitochondrial Proteins NLRX1 and TUFM Form a Complex that Regulates Type I Interferon and Autophagy. *Immunity* 36, 933–946.
- Li, H., Kobayashi, M., Blonska, M., You, Y., and Lin, X. (2006). Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* 281, 13636–13643.
- Li, M. T., Di, W., Xu, H., Yang, Y. K., Chen, H. W., Zhang, F. X., Zhai, Z. H., and Chen, D. Y. (2013). Negative Regulation of RIG-I-Mediated Innate Antiviral Signaling by SEC14L1. *J. Virol.* 87, 10037–10046.
- Li, X.D., Sun, L., Seth, R.B., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2005). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17717–17722.
- Li, Y., Kelly, W.G., Logsdon, J.M., Schurko, A.M., Harfe, B.D., Hill-Harfe, K.L., and Kahn, R.A. (2004). Functional genomic analysis of the ADP-ribosylation factor family of GTPases: phylogeny among diverse eukaryotes and function in *C. elegans*. *FASEB J.* 18, 1834–1850.
- Lin, R., Yang, L., Nakhaei, P., Sun, Q., Sharif-Askari, E., Julkunen, I., and Hiscott, J. (2006). Negative regulation of the retinoic acid-inducible gene I-induced antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *J. Biol. Chem.* 281, 2095–2103.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wölk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., et al. (2005). Virology: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623–626.
- Liu, S., Chen, J., Cai, X., Wu, J., Chen, X., Wu, Y.T., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013). MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife* 2, e00785.
- \*Loo, Y.M., and Gale, M. (2011). Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* 34, 680–692.
- Lu, C., Xu, H., Ranjith-Kumar, C.T., Brooks, M.T., Hou, T.Y., Hu, F., Herr, A.B., Strong, R.K., Kao, C.C., and Li, P. (2010). The structural basis of 5' triphosphate double-stranded RNA recognition by RIG-I C-terminal domain. *Structure* 18, 1032–1043.
- Luo, D., Ding, S.C., Vela, A., Kohlway, A., Lindenbach, B.D., and Pyle, A.M. (2011). Structural insights into RNA recognition by RIG-I. *Cell* 147, 409–422.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S.M., and Yi, M. (2008). NS3 Helicase Domains Involved in Infectious Intracellular Hepatitis C Virus Particle Assembly. *J. Virol.* 82, 7624–7639.
- Maharaj, N.P., Wies, E., Stoll, A., and Gack, M.U. (2012). Conventional Protein Kinase C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ) and PKC- $\beta$  Negatively Regulate RIG-I Antiviral Signal Transduction. *J. Virol.* 86, 1358–1371.
- McGivern, D.R., Masaki, T., Lovell, W., Hamlett, C., Saalau-Bethell, S., and Graham, B. (2015). Protease Inhibitors Block Multiple Functions of the NS3/4A Protease-Helicase during the Hepatitis C Virus Life Cycle. *J. Virol.* 89, 5362–5370.
- Meewan, I., Zhang, X., Roy, S., Ballatore, C., O'Donoghue, A.J., Schooley, R.T., and Abagyan, R. (2019). Discovery of New Inhibitors of Hepatitis C Virus NS3/4A Protease and Its D168A Mutant. *ACS Omega* 4, 16999-17008.

- Mérour, E., Jami, R., Lamoureux, A., Bernard, J., Brémont, M., and Biacchesi, S. (2019). A20 (tnfaip3) is a negative feedback regulator of RIG-I-Mediated IFN induction in teleost. *Fish Shellfish Immunol.* 84, 857–864.
- Michallet, M.C., Meylan, E., Ermolaeva, M.A., Vazquez, J., Rebsamen, M., Curran, J., Poeck, H., Bscheider, M., Hartmann, G., König, M., et al. (2008). TRADD Protein Is an Essential Component of the RIG-like Helicase Antiviral Pathway. *Immunity* 28, 651–661.
- Moore, C.B., Bergstralh, D.T., Duncan, J.A., Lei, Y., Morrison, T.E., Zimmermann, A.G., Accavitti-Loper, M.A., Madden, V.J., Sun, L., Ye, Z., et al. (2008). NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* 451, 573–577.
- Morosky, S.A., Zhu, J., Mukherjee, A., Sarkar, S.N., and Coyne, C.B. (2011). Retinoic acid-induced gene-1 (RIG-I) associates with nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2) to negatively regulate inflammatory signaling. *J. Biol. Chem.* 286, 28574–28583.
- Murali, A., Li, X., Ranjith-Kumar, C.T., Bhardwaj, K., Holzenburg, A., Li, P., and Kao, C.C. (2008). Structure and function of LGP2, a DEX(D/H) helicase that regulates the innate immunity response. *J. Biol. Chem.* 283, 15825–15833.
- Nakano, T., Lau, G.M.G., Lau, G.M.L., Sugiyama, M., and Mizokami, M. (2012). An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver Int.* 32, 339–345.
- Narayan, K., Waggoner, L., Pham, S.T., Hendricks, G.L., Waggoner, S.N., Conlon, J., Wang, J.P., Fitzgerald, K.A., and Kang, J. (2014). TRIM13 Is a Negative Regulator of MDA5-Mediated Type I Interferon Production. *J. Virol.* 88, 10748–10757.
- Nazmi, A., Mukhopadhyay, R., Dutta, K., and Basu, A. (2012). STING mediates neuronal innate immune response following japanese encephalitis virus infection. *Sci. Rep.* 2,347.
- Nguyen, N.T.H., Now, H., Kim, W.J., Kim, N., and Yoo, J.Y. (2016). Ubiquitin-like modifier FAT10 attenuates RIG-I mediated antiviral signaling by segregating activated RIG-I from its signaling platform. *Sci. Rep.* 6, 23377.
- Nie, L., Xu, X.X., Xiang, L.X., Shao, J.Z., and Chen, J. (2017). Mutual regulation of NOD2 and RIG-I in zebrafish provides insights into the coordination between innate antibacterial and antiviral signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1147.
- Pan, Y., Li, R., Meng, J.-L., Mao, H.-T., Zhang, Y., and Zhang, J. (2014). Smurf2 Negatively Modulates RIG-I-Dependent Antiviral Response by Targeting VISA/MAVS for Ubiquitination and Degradation. *J. Immunol.* 192, 4758–4764.
- Peisley, A., Lin, C., Wu, B., Orme-Johnson, M., Liu, M., Walz, T., and Hur, S. (2011). Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 21010–21015.
- Peisley, A., Jo, M.H., Lin, C., Wu, B., Orme-Johnson, M., Walz, T., Hohng, S., and Hur, S. (2012). Kinetic mechanism for viral dsRNA length discrimination by MDA5 filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3340-3349.
- Piccininni, S., Varaklioti, A., Nardelli, M., Dave, B., Raney, K.D., and McCarthy, J.E.G. (2002). Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4b membrane protein. *J. Biol. Chem.* 277, 45670–45679.



Qin, Y., Xue, B., Liu, C., Wang, X., Tian, R., Xie, Q., Guo, M., Li, G., Yang, D., and Zhu, H. (2017). NLRX1 Mediates MAVS Degradation To Attenuate the Hepatitis C Virus-Induced Innate Immune Response through PCBP2. *J. Virol.* 91, e01264-17.

Quicke, K.M., Kim, K.Y., Horvath, C.M., and Suthar, M.S. (2019). RNA Helicase LGP2 Negatively Regulates RIG-I Signaling by Preventing TRIM25-Mediated Caspase Activation and Recruitment Domain Ubiquitination. *J. Interf. Cytokine Res.* 39, 669-683.

\*Ranji, A., and Boris-Lawrie, K. (2010). RNA helicases. *RNA Biol.* 7, 775-787.

Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.-M., Owen, D., Johnson, C.L., Sinha, S.C., Akira, S., Fujita, T., Gale, M., and Jr. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 582-587.

Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., and Gale, M. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 454, 523-527.

\*Scheel, T.K.H., and Rice, C.M. (2013). Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat. Med.* 19, 837-849.

Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., and Chen, Z.J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122, 669-682.

Sun, X., Sun, L., Zhao, Y., Li, Y., Lin, W., Chen, D., and Sun, Q. (2016). MAVS maintains mitochondrial homeostasis via autophagy. *Cell Discov.* 2, 16024.

Takahashi, K., Kumeta, H., Tsuduki, N., Narita, R., Shigemoto, T., Hirai, R., Yoneyama, M., Horiuchi, M., Ogura, K., Fujita, T., et al. (2009). Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: Identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. *J. Biol. Chem.* 284, 17465-17474.

\*Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805-820.

Taylor, J.G., Zipfel, S., Ramey, K., Vivian, R., Schrier, A., Karki, K.K., Katana, A., Kato, D., Kobayashi, T., Martinez, R., et al. (2019). Discovery of the pan-genotypic hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor voxilaprevir (GS-9857): A component of Vosevi®. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 29, 2428-2436.

Tsai, T.Y., Wang, W.T., Li, H.K., Chen, W.J., Tsai, Y.H., Chao, C.H., and Wu Lee, Y.H. (2017). RNA helicase DDX3 maintains lipid homeostasis through upregulation of the microsomal triglyceride transfer protein by interacting with HNF4 and SHP. *Sci. Rep.* 7, 41452.

Vitour, D., Dabo, S., Pour, M.A., Vilasco, M., Vidalain, P.O., Jacob, Y., Mezel-Lemoine, M., Paz, S., Arguello, M., Lin, R., et al. (2009). Polo-like kinase 1 (PLK1) regulates interferon (IFN) induction by MAVS. *J. Biol. Chem.* 284, 21797-21809.

Wang, L., Du, F., and Wang, X. (2008). TNF- $\alpha$  Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways. *Cell* 133, 693-703.

Wang, L., Li, S., and Dorf, M.E. (2012a). NEMO Binds Ubiquitinated TANK-Binding Kinase 1 (TBK1) to Regulate Innate Immune Responses to RNA Viruses. *PLoS One* 7, e43756.

Wang, W., Jiang, M., Liu, S., Zhang, S., Liu, W., Ma, Y., Zhang, L., Zhang, J., and Cao, X. (2016). RNF122 suppresses antiviral type I interferon production by targeting RIG-I CARDs to mediate RIG-I degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 9581-9586.

Wang, Y., Tong, X., Omoregie, E.S., Liu, W., Meng, S., and Ye, X. (2012b). Tetraspanin 6 (TSPAN6) negatively regulates retinoic acid-inducible gene I-like receptor-mediated immune signaling in a ubiquitination-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 287, 34626–34634.

Wies, E., Wang, M.K., Maharaj, N.P., Chen, K., Zhou, S., Finberg, R.W., and Gack, M.U. (2013). Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity* 38, 437–449.

World Health Organization (2017). Global Hepatitis report 2017, 1-83.

Wu, B., Peisley, A., Richards, C., Yao, H., Zeng, X., Lin, C., Chu, F., Walz, T., and Hur, S. (2013). Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell* 152, 276–289.

Wu, F., Niu, Z., Zhou, B., Li, P., and Qian, F. (2019). PSMB1 negatively regulates the innate antiviral immunity by facilitating degradation of IKK- $\epsilon$ . *Viruses* 11, 99.

Xiang, W., Zhang, Q., Lin, X., Wu, S., Zhou, Y., Meng, F., Fan, Y., Shen, T., Xiao, M., Xia, Z., et al. (2016). PPM1A silences cytosolic RNA sensing and antiviral defense through direct dephosphorylation of MAVS and TBK1. *Sci. Adv.* 2, e1501889.

Yang, Y.K., Qu, H., Gao, D., Di, W., Chen, H.W., Guo, X., Zhai, Z.H., and Chen, D.Y. (2011). ARF-like protein 16 (ARL16) inhibits RIG-I by binding with its C-terminal domain in a GTP-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 286, 10568–10580.

Yoo, Y.S., Park, Y.Y., Kim, J.H., Cho, H., Kim, S.H., Lee, H.S., Kim, T.H., Kim, Y.S., Lee, Y., Kim, C.J., et al. (2015). The mitochondrial ubiquitin ligase MARCH5 resolves MAVS aggregates during antiviral signalling. *Nat. Commun.* 6, 7910.

You, F., Sun, H., Zhou, X., Sun, W., Liang, S., Zhai, Z., and Jiang, Z. (2009). PCBP2 mediates degradation of the adaptor MAVS via the HECT ubiquitin ligase AIP4. *Nat. Immunol.* 10, 1300–1308.

\*Zeisel, M.B., Felmler, D.J., and Baumert, T.F. (2013). Hepatitis C Virus Entry. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 369, 87–112.

Zhao, C., Jia, M., Song, H., Yu, Z., Wang, W., Li, Q., Zhang, L., Zhao, W., and Cao, X. (2017). The E3 Ubiquitin Ligase TRIM40 Attenuates Antiviral Immune Responses by Targeting MDA5 and RIG-I. *Cell Rep.* 21, 1613–1623.

Zhao, T., Yang, L., Sun, Q., Arguello, M., Ballard, D.W., Hiscott, J., and Lin, R. (2007). The NEMO adaptor bridges the nuclear factor- $\kappa$ B and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nat. Immunol.* 8, 592–600.

Zhong, H., Wang, D., Fang, L., Zhang, H., Luo, R., Shang, M., Ouyang, C., Ouyang, H., Chen, H., and Xiao, S. (2013). Ubiquitin-specific proteases 25 negatively regulates virus-induced type I interferon signaling. *PLoS One* 8, e80976.

Zhou, P., Ding, X., Wan, X., Liu, L., Yuan, X., Zhang, W., Hui, X., Meng, G., Xiao, H., Li, B., et al. (2018). MLL5 suppresses antiviral innate immune response by facilitating STUB1-mediated RIG-I degradation. *Nat. Commun.* 9, 1243.

AASLD/IDSA HCV Guidance Panel (2015). Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 62, 932–954.

<https://www.rndsystems.com/pathways/rig-i-like-receptor-signaling-pathways#print-copy-form>