

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

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Czech Jauce**

Role DNA senzorů cGAS a IFI16 ve virových infekcích  
The role of DNA sensors cGAS and IFI16 in virus infections

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2021



## Poděkování

Mnohokrát děkuji své školitelce doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za poskytnutí mnoha užitečných rad, dostupnost konstruktivních konzultací, a především za čas, který mi věnovala při vypracování této bakalářské práce.

## **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, 3.5.2021

Podpis



## **Abstrakt**

Důležitou součástí vrozené imunity člověka jsou protivirové interferony. Jejich indukce spočívá v aktivaci signálních drah, které jsou spuštěny po rozpoznání patogenní RNA a DNA v buňce, nebo endogenní DNA nepřírodně v buňce umístěné. Tato detekce je zprostředkována RNA a DNA senzory. Mezi nejdůležitější DNA senzory patří cGAS a IFI16, jejichž společná funkce je schopnost indukovat interferon přes centrální adaptérovou molekulu signalizace STING. Oba senzory se vyskytují v cytoplazmě i jádře buňky. cGAS plní kanonické funkce spojené s detekcí virové DNA v cytoplazmě, syntézou dinukleotidu cGAMP, který aktivuje adaptérový protein – STING. V jádře cGAS inhibuje opravy DNA a podporuje tumorogenezi. IFI16 rozpoznává genomy DNA virů v jádře, kde také působí jako restriční faktor potlačující replikaci virů v jádře. V cytoplazmě interaguje je důležitou součástí komplexu s proteinem STING. Novější studie poukazují na nové nekanonické funkce cGAS, které se pojí k autofágii a roli IFI16 v indukci odpovědi vrozené imunity při poškození DNA.

**Klíčová slova:** vrozená imunita, indukce interferonů, RNA senzory, DNA senzory, STING, cGAS, IFI16

## **Abstract**

Antiviral interferons play a crucial role in human innate immunity. The induction of interferons relies on the activation of signalization cascades which are initialized by the recognition of pathogen-derived RNA and DNA in the cell or unnaturally located endogenous DNA within the cell. This recognition depends on RNA and DNA sensors. Among the most important sensors are cGAS and IFI16 which interact with the central adapter molecule of signalling – STING. Both of these sensors are located in the cytosol and the nucleus of the cell. cGAS's canonical functions include the detection of viral DNA in the cytosol, the synthesis of dinucleotide called cGAMP and subsequent activation of the adaptor protein STING. In the nucleus cGAS inhibits the repair of damaged DNA and therefore promotes tumorigenesis. IFI16, however, detects genomes of DNA viruses in the nucleus, where it also acts as a restriction factor therefore abrogating viral replication. In the cytosol IFI16 is an important component of a complex comprised of IFI16 and STING. Newer studies highlight the non-canonical roles of cGAS in autophagy and IFI16 in the IFI16-mediated induction of innate immune response due to DNA damage.

**Key words:** innate immunity, induction of interferons, RNA sensors, DNA sensors, STING, cGAS, IFI16

## Obsah

Abstrakt .....	i
Seznam zkratek.....	iii
1. Úvod.....	1
2. Vrozená imunita .....	3
2.1. Inflamazomy .....	5
2.2 Interferony.....	6
3. Rozpoznání nukleových kyselin .....	10
3.1 RNA senzory.....	11
3.2. DNA Senzory .....	14
3.3. STING .....	18
4. cGAS.....	19
4.1. cGAS – STING signalizační dráha .....	21
4.2. Role cGAS v detekci endogenní DNA.....	23
4.2.1. Funkce cGAS v jádře .....	24
5. IFI16 .....	26
5.1. Funkce IFI16 v jádře infikovaných buněk.....	26
5.2. Význam cytosolické lokalizace IFI16 .....	28
5.2.1. Role IFI16 v nekanonické aktivaci STING .....	28
6. Závěr .....	29
7. Seznam použité literatury.....	30

## Seznam zkratk

14-3-3ε	mitochondrial targeting chaperone protein	transportační ochranný protein 14-3-3ε
2'-5' OAS	2'-5' oligoadenylate synthase	2'-5' oligoadenylát syntáza
AICD	activation-induced cell death	aktivitou vyvolaná buněčná smrt
AIM2	absent in melanoma 2	cytosolický senzor AIM2
ALRs	AIM2-like receptors	receptory podobné AIM-2
APAF1	apoptotic protease activating factor 1	aktivační faktor 1 apoptotické proteázy
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	CARD obsahující protein spojený s buněčnou smrtí
ATG5	autophagy related 5	protein 5 související s autofágií
ATM	ataxia telangiectasia mutated	kináza spojená s poškozením DNA
ATP	adenosin triphosphate	adenosin trifosfát
BAX	BCL2-associated X protein	pro-apoptotický protein BAX
BLK	B-lymphoid tyrosin kinase	B-lymfoidní tyrosin kináza
BMDMs	bone-marrow derived macrophages	makrofágy derivované z kostní dřeně
bp	base pair	pár bazí
BRCA1	breast cancer type 1 susceptibility protein 1	protein 1 karcinomu prsu; nádorový supresor
C646	inhibitor of p300	inhibitor p300 histon acetyl- transferázy
CARD	caspase activation and recruitment domain	doména aktivující a rekrutující kaspázy
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	chemokin spojený s NF-κB signalizační dráhou
c-di-GMP	cyclic diguanylate	cyklický diguanylát
CDNs	cylic dinucleotides	cyklické dinukleotidy
cGAMP	cyclic guanosin- monophosphate-adenosin monophosphate	cyklický guanosin monofosfát- adenosin monofosfát

cGAS	cGAMP synthase	cGAMP syntáza
cGAS $\Delta$ N	cGAS lacking N terminus	cGAS neobsahující N konec
COP-II	coat protein complex II	proteinový komplex sloužící k vesikulárnímu transportu
CPG DNA	cytosin-phosphate-guanosin DNA	cytosin-fosfát-guanosin DNA
CTD	C-terminal domain	C-koncová doména
DAI	DNA dependent activator of IFNs	aktivátor interferonů závislý na DNA
DAMPs	damage-associated molecular patterns	molekulární motivy spojené s poškozením
DBD	DNA binding domain	DNA vazebná doména
DC 2	dendritic cells subtype 2	dendritické buňky poddruhu 2
DDK41	The DEAD-box helicase 41	cytosolický senzor RNA helikáza DDX41
DDR	DNA damage response	odpověď na poškození DNA
DDX	DEAD-BOX helicase	DEAD-BOX helikáza
DENV	Dengue virus	virus Dengue
DHX	DEAH-BOX helicase	DEAH-BOX helikáza
DNA-PK	DNA protein kinase	DNA protein kináza
DSB	double-strand DNA breaks	zlomy dsDNA
dsDNA	double-stranded DNA	dvouvláknová DNA
EBV	Epstein-Barr virus	Virus Epstein-Barrové
eIF3	elongation initiation factor 3	elongační iniciační faktor 3
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment	signalizační kompartment mezi ER a Golgiho aparátem
FADD	Fas-associated death domain	doména buněčné smrti spojená s Fas
Fas	apoptotic receptor Fas	receptor Fas buněčné smrti
GAF	$\gamma$ -associated factor	$\gamma$ -spojený faktor
GAS	$\gamma$ -activated sequence	$\gamma$ -aktivovaná sekvence
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
GTP	guanosin triphosphate	guanosin trifosfát
H2B	histone 2B	histon 2b



H3K9me3	histone 3 lysin 9	lysin 9 na histonu H3
HeLa	Henrietta Lacks cell line	buněčná linie Henrietta Lacks
HIN	hematopoetic, expression, interferon-inducible, nuclear localization domain	HIN doména sloužící k vazbě DNA
HIV	human immunodeficiency virus	virus lidské imunodeficience
HMGB1	high-mobility group box protein 1	bakteriální protein měnící strukturu DNA
HMVEC	human microvascular endothelial cells	lidské mikrovaskulární endoteliální buňky
HR	homologous recombination	homologní rekombinace
HSV-1	herpes simplex virus 1	herpes simplex virus 1
HU	mitochondrial protein HU	mitochondriální protein schopný měnit strukturu DNA
ICP0	infected cell protein 0	časný protein herpesvirové infekce
IFI16	interferon-inducible protein 16	interferonem indukovaný protein 16
IFNAR	interferon $\alpha$ receptor	receptor interferonu $\alpha$
IFNs	interferons	interferony
IKK $\epsilon$	inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase subunit $\epsilon$	inhibitor NF- $\kappa$ B kinázové podjednotky $\epsilon$
IL-1 RA	interleukin 1 receptor antagonist	antagonista receptoru interleukinu1
IL-R	interleukin receptor	receptor interleukinu
ILs	interleukins	interleukiny
iNOs	inducible nitric oxide synthase	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
IRAK	interleukin-1 receptor associated kinase	kináza spojená s receptorem pro interleukin1
IRFs	interferon regulatory factors	regulační faktory interferonů
ISGF3	IFN-stimulated gene factor 3	interferony stimulovaný genový faktor 3
ISGs	interferon-stimulated genes	geny stimulované inteferony

ISRE	IFN-stimulated response element	interferony stimulovaný reakční element
JAKs	Janus kinases	Janusovy kinázy
JNK	c-Jun amino-terminal kinase	signální dráha indukovaná IFN typu I
KFNAs	karyopherins	karyoferiny
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	virus Kaposiho sarkomu
L929	fibroblast cell line	myší fibroblastická buněčná linie
LANA	latency-associated nuclear antigen	latentní jaderný antigen inhibující produkci cGAMP
LAP	LC3-associated phagocytosis	fagocytóza spojená s proteinem LC3
LBD	ligand-binding domain	ligand-vazebná doména
LC3	microtubule-associated protein 1A/1B light-chain 3	protein autofagického mechanismu
LGP2	laboratory of genetis and physiology 2	druh cytosolického senzoru RNA
LIRs	LC3-interacting regions	vazebné sekvenční oblasti pro autofagický protein LC3
LLC	mouse lung cancer cell line	buněčná linie myší rakoviny plic
LRR	leucine rich repeat	repetice bohatá na leucin
LRRFIP1	leucine-rich repeat flightless-interacting containing protein-1	DNA senzor bohatý na leucinové repetice
Mab21	male abnormal 21	mužský abnormální protein 21
MAM	mitochondria-associated membrane	mitochondriálně spojená membrána
MAPK	mitogen-associated protein kinase	mitogenově spojená protein kináza
MAVS	mitochondrial antiviral signalling protein	mitochondriální protivirový signalizační protein
MDA5	melanoma differentiation-associated gene 5	druh cytosolického senzoru RNA

MDDCs	human monocyte-derived dendritic cells	lidské dendritické buňky derivované z monocytů
MHC I	major histocompatibility complex I	hlavní histokompatibilní komplex I
MLV	murine leukemia virus	virus myši leukémie
MRE11	meiotic recombination homolog 11A	meiotický rekombinační homolog 11
MyD88	myeloid differentiation primary-response protein 88	adaptérový protein aktivující interferonové regulační faktory
NBD	nucleotide-binding domain	nukleotid vázající doména
NES	nuclear export signal	jaderný exportační signál
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B	nukleární faktor $\kappa$ B
NHEJ	non-homologous end-joining systém	nehomologní spojování konců
NK	natural killer cell	NK buňky
NLRs	NOD-like receptors	NOD-podobné receptory
NLS	nuclear localization signal	jaderný lokalizační signál
ORF52	gammaherpesvirus-specific tegument protein	herpesvirový tegumentní protein tlumící enzymatickou aktivitu cGAS
p204	mouse orthologue of IFI16	myši ortolog IFI16
p300	histone acetyl transferase	histon acetyl-transferáza
p53	tumor suppressor 53	nádor tlumící protein 53
P65	subunit of NF- $\kappa$ B	podjednotka NF- $\kappa$ B
PAF1	polymerase II-associated factor1	transkripční faktor inhibující replikaci herpesvirů
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	molekulární motivy spojené s patogeny
PARP1	poly ADP-ribose polymerase I	poly AD-ribóza polymeráza I
PARP1	poly ADP-ribose polymerase I	poly AD-ribóza
PI[4,5] P2	phosphatidyl inositol diphosphate	fosfatidyl inositol difosfát
PKR	dsRNA activated kinase	dsRNA aktivovaná kináza
PRRs	pattern-recognition receptors	receptory rozpoznávající motivy

PYD	pyrin domain	pyrinová doména
RAD50	DNA repair protein RAD50	DNA-vazebný protein RAD50
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted	interferonem stimulovaný gen rané fáze infekce
RD	repressor domain	represorová doména
RIG-I	retinoic acid-induced gene I	gen I indukovaný kyselinou retinovou
RLRs	RIG-I-like receptors	RIG-I-podobné receptory
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
SEC24C	COP II coat complex component	složka komplexu proteinového transportu COP II
SEC61 $\beta$	protein transport protein SEC61 subunit $\beta$	translokonová podjednotka SEC61 $\beta$
SIV	simian immunodeficiency virus	virus opičí imunodeficiencie
ssDNA	single-stranded DNA	jedno vláknová DNA
STAT	signal transducer and activator of transcription	signální transduktor a aktivátor transkripce
STING	stimulator of IFN genes	stimulátor interferonem podmíněných genů
TANK	TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B asociovaný s členem rodiny TRAF proteinů, produkt lidského genu TANK
TBK1	TANK-binding kinase 1	TANK vazebná kináza 1
TBM	TBK1-binding motif	TBK1-vazebný motiv
TFAM	mitochondrial transcription factor A	mitochondriální transkripční faktor A
TGFs	transforming growth factors	transformující růstové faktory
THP1	The human leukemia monocytic cell line	buněčná linie lidských monocytů
TIR	Toll/IL-1 receptor domain	doména spojující TLR s adaptérovou molekulou MyD88
TLRs	Toll-like receptors	Toll-like receptory
TNFs	tumour necrosis factors	faktory nekrózy nádorů

TRAF	TNF receptor-associated factor	faktor spojený s TNF receptorem
TRAP	translocon-associated protein	translokonově asociovaný protein
TREX1	three prime repair exonuclease 1	druh Dnázy štěpící DNA v cytosolu
TRIF	Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor, including IFN- $\beta$	adaptérová doména aktivující interferonové regulační faktory
TRIM25	tripartite motif-containing protein 25	ubiquitinylační protein TRIM25
TYK2	tyrosin kinase 2	tyrosin kináza 2
U2OS	human osteosarcoma cell	lidské osteosarkomové buňky
UBTF	upstream binding transcription factor	transkripční faktor inhibující replikaci herpesvirů
WT	wild type	neupravený typ
$\gamma$ c	$\gamma$ chain	řetězec $\gamma$



## 1. Úvod

Viry jsou nejpočetnější a nejdiferzifikovanější formou života, jenž ho provázejí od jeho prehistorických počátků.

Viry jakožto obligátní vnitrobuněční parazité vedly, vedou a budou vést neustálý boj se svými hostiteli, kteří se proti virové infekci snaží bránit. Tento proces se nazývá „závod ve zbrojení“ a v průběhu evoluce života hraje velmi důležitou roli, jelikož při něm došlo k vyvinutí obranných mechanismů jak u prokaryot, tak u eukaryot. Jelikož je „závod ve zbrojení“ vzájemný, tak viry vynalézají způsoby, jak tyto obranné mechanismy zneškodnit, či je obejít. Jelikož je generační doba virů velmi krátká a koevoluce s jejich hostiteli trvá již věky, neexistuje téměř žádný obranný mechanismus, který by nedokázaly překonat. I přes to, tento svět není dominován viry z několika důvodů. Fundamentální princip parazitismu spočívá v přežití hostitele co nejdéle, aby jeho parazit z tohoto stavu mohl čerpat co nejvíce. Předčasná smrt hostitele, či mutace, která by přinášela velkou výhodu viru, avšak značně snížila populaci hostitelů, ultimátně vede k ztrátovým podmínkám na obou stranách. Počet druhů virů, co způsobují letální virové infekce je oproti počtu komenzálních vztahů viru s hostitelem minimální, což můžeme například pozorovat v mikrobiomu lidského střeva, kde bakteriofágové infikují a eliminují střevní bakterie.

Druhý důvod, který je pro tuto práci důležitější a pojí se škodlivými virovými infekcemi je existence komplexního imunitního systému. Imunitní systém je složen z velkého množství složek a mechanismů, které jsou vzájemně funkčně propojené a slouží k omezení šíření viru dále v organismu. Mezi nejdůležitější složky buněčné obrany před viry patří složky vrozené imunity – interferony, které jsou indukovány při infekci. Klíčovými molekulami pro indukci interferonů jsou receptory schopné rozpoznat patogenní struktury. Pro rozpoznání virů hrají důležitou roli senzory nukleových kyselin. Tato práce je snahou shrnout poznatky o důležitých senzorech cGAMP syntázy (cGAS) a interferonem indukovaném proteinu 16 (IFI16) a adaptérové molekule STING (stimulátor interferonem podmíněných genů), přes kterou vedou signální dráhy k produkci interferonu.

**Cílem této práce je:**

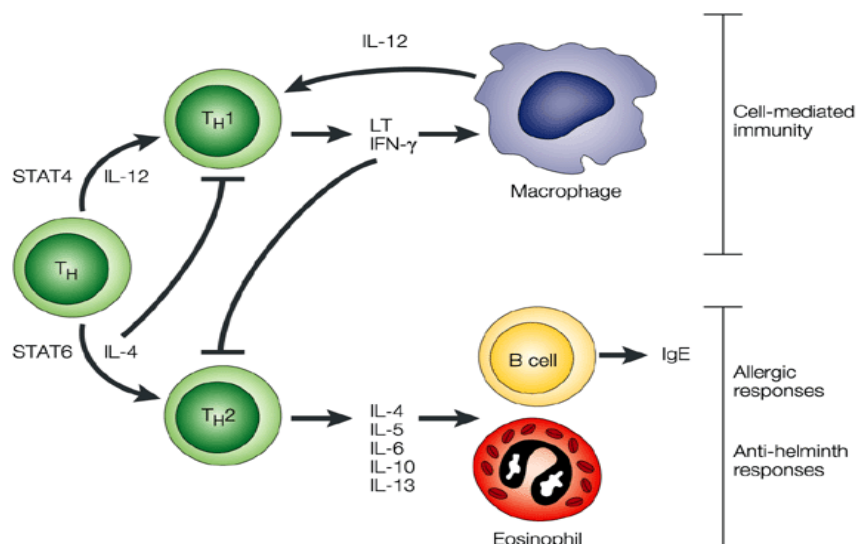
představit DNA senzory cGAS a IFI16 jako klíčové molekuly pro detekci genomů DNA virů. Práce by měla shrnout poznatky o způsobech, jakým tyto sensory detekují virové DNA a indukují signální dráhy vedoucí k produkci interferonu.



## 2. Vrozená imunita

Vrozená imunita je termín označující obranný systém hostitele před infekcí, často nazývaný první linií obrany. Vrozenou imunitu je možné rozdělit do několika kategorií. Mezi tyto kategorie patří vnější fyzické bariéry, jako je kůže, nebo sliznice, humorální a buněčně podmíněné mechanismy, shrnuto v (Zimmerman et al., 2010). Vrozená imunita současně slouží k udržování homeostáze, regulaci a aktivaci adaptivní imunity (Janeway, 1989). Tato práce se bude podrobněji zabývat humorální složkou, konkrétně cytokiny.

Cytokiny jsou rozpustné proteiny vrozené imunity, které jsou konzervovány napříč všemi obratlovci (Riera Romo et al., 2016)\*. Funkcí cytokinů je velké množství, mezi ty nejmarkantnější patří role v diferenciaci, regulaci a vývoji buněk imunitního systému. Účinky cytokinů jsou pleiotropní a některé hrají roli v produkci ostatních druhů cytokinů. Z toho vyplývá, že jakákoliv porucha v regulaci těchto proteinů vede ke zhoršenému stavu vrozené i adaptivní imunity a k autoimunitním nemocem. Cytokiny můžeme rozdělit do několika skupin, které se od sebe odlišují svými biologickými aktivitami, genovými sekvencemi, receptory a signálními drahami, se kterými jsou funkčně spojené. Do této skupiny spadají faktory nekrózy nádorů (TNFs), transformující růstové faktory (TGFs), interleukiny (ILs) a interferony (IFNs). K tvorbě cytokinů dochází, když se T lymfocyt aktivuje po střetnutí s antigenem, načež produkuje IL-2, který navozuje imunitní odpověď ve formě klonální expanze a následné produkce ostatních pro-zánětlivých cytokinů (O'Shea et al., 2002)\*. CD4<sup>+</sup> T lymfocyty se diferencují do dvou druhů pomocných T buněk: T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2 (Mosmann et al., 1986). Jak je ukázáno na Obr.1, tato diferenciaci je podmíněná IL-12, který aktivuje signální transduktor a aktivátor transkripce (STAT4) v lymfocytech. Zároveň T<sub>H</sub>1 produkují IFN- $\gamma$ , který bude podrobněji zmíněn později. T<sub>H</sub>2 tvoří IL-4, tlumící interleukin buněčně podmíněné vrozené imunity, jehož druhá funkce spočívá v navození alergických reakcí. Oba druhy hrají svou roli v potlačení vrozené imunity přes tvorbu imunopresivních cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$  (O'Shea et al., 2002)\*.



Nature Reviews | Immunology

**Obr. 1:** Schéma diferenciacie CD4<sup>+</sup> T lymfocytů do druhů pomocných T buněk T<sub>H1</sub> a T<sub>H2</sub> skrze IL-4 a IL-12. Zatímco T<sub>H1</sub> podporuje buněčně podmíněnou imunitu a dále poskytuje zvýšenou obranu před vnitrobuněčnými parazity, T<sub>H2</sub> působí protichůdně. IL-4 narušuje diferenciaci prvního druhu a potlačuje buněčně-podmíněnou imunitu, avšak navozuje alergické reakce a brání hostitele před helminty (O'Shea et al., 2002).

Mezi další významné interleukiny patří IL-1, IL-2 a IL-6, jak již bylo zmíněno výše, IL-1 a IL-6 jsou sekretovány v epidermis. Interleukin 1 se vyskytuje ve dvou variantách: IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Obě varianty vykazují podobné, avšak ne stejné biologické aktivity po navázání na svůj receptor IL-1R. Mezi tyto aktivity patří produkce širokého spektra cytokinů, chemokinů a navození zánětlivých reakcí, ve kterých je IL-1 nadřazený ostatním interleukinům. Aktivovaná kaspáza-1, zahazuje tvorbu IL-1 a jeho štěpení do aktivních forem (Keller et al., 2008). Strukturálním homologem IL-1 je IL-1 RA, který se váže na IL-1R, avšak neinicuje žádné imunitní odpovědi, a tudíž je antagonistou IL-1 (Eisenberg et al., 1990). Interleukin 1 taktéž indukuje produkci IL-6 (O'Shea et al., 2002)\*.

Interleukin 2 má jak imunopresivní, tak i imunostimulační účinky. Za zmínku stojí schopnost indukce cytokinů IFN- $\gamma$  a TNFs, bujení lymfoidních buněk, zamezení i navození apoptózy lymfocytů, což v prvním případě vede ke stimulaci imunitních odpovědí (O'Shea et al., 2002)\*. Takzvaná pasivní buněčná smrt nastává, když se zastaví interleukinová signalizace, což vede k vypuštění cytochromu c a aktivačního faktoru 1 apoptotické proteázy (APAF1), který aktivuje kaspázu 9 a další s ní spojené kaspázy, což vede k buněčné smrti. Přítomnost IL-2 pasivní apoptózu neguje (Lenardo, 1991). Druhý typ buněčné smrti spojený s IL-2 je aktivitou vyvolaná buněčná smrt (AICD), při které receptor Fas (CD95) je okupován interleukinem 2. Při opuštění Fas receptoru dochází k rekrutaci domény buněčné smrti spojené s Fas (FADD), což podobně jako při pasivní apoptóze vede k aktivaci kaskády kaspáz a

následné buněčné smrti. Naopak diferenciaci  $T_H2$ , pro kterou je IL-2 důležitý, jakožto i apoptóza vedou k potlačení imunitního systému. Stejně jako IL-1 má IL-2 svůj receptor zvaný IL-2R, což je komplex složený ze tří podjednotek: IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  a řetěz  $\gamma_c$ . Vazebné místo pro interleukin je právě na  $\gamma_c$  a vyskytuje se i u ostatních typů interleukinů, jako IL-4, IL-7, IL-9, IL-14 (O'Shea et al., 2002)\*.

Interleukin 6 opět spadá svými funkcemi mezi pleiotropní interleukiny. Je důležitý pro množení B lymfocytů, hematopoézu, reguluje imunologické reakce akutní fáze a navozuje zánětlivé reakce. Jak již bylo zmíněno výše, jeho produkce je indukována IL-1 a tudíž koncentrace IL-6 v séru odráží biologickou aktivitu IL-1 (Kleemann et al., 2008)\*. Mimo jiné i podporuje diferenciaci  $T_H2$  přes indukci IL-4, ale zároveň tlumí diferenciaci  $T_H1$  nezávisle na IL-4 (O'Shea et al., 2002)\*.

TNFs jsou další skupinou cytokinů, které, podobně jako ostatní složky humorální imunity, mají dvojité účinky na imunitní odpovědi a to imunosupresivní, tak i imunostimulační. Pro-zánětlivé charakteristiky TNFs jsou obecně známy, kdy aktivují makrofágy a dochází k indukci pro-zánětlivých cytokinů jako IL-1 a IL-6, avšak inhibiční účinky byly odhaleny později. K inhibici dochází přes buněčnou smrt T lymfocytů a zablokování jejich signalizace přes receptory a na konec stimulují tvorbu cytokinů potlačujících imunitní odpovědi (O'Shea et al., 2002)\*.

V průběhu evoluce se vyvinuly určité detekční systémy, které jsou schopny rozlišit cizí od vlastního, homeostázi a stav nebezpečí. Vrozená imunita rozpoznává molekulární motivy spojené s patogeny (PAMPs), které pochází z invadujících patogenů a molekulární motivy spojené s poškozením (DAMPs), molekuly vznikající endogenním stresem. Toto rozpoznávání je vykonáváno receptory rozpoznávajícími molekulární motivy (PRRs). Po interakci PRRs s PAMPs, či DAMPs se spouští signální dráhy vedoucí k produkci IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  a dalších cytokinů (Chen & Nuñez, 2010)\*.

## 2.1. Inflamazomy

Jak je známo, zánětlivá reakce je akutní odpověď těla na infekci, nebo porušení tkáně ve snaze minimalizovat poškození organismu. Se zánětlivými reakcemi se pojí inflamazomy, skupina multimerních cytosolických proteinových komplexů schopných detekovat endogenní a exogenní stimulanty, které svou přítomností navozují zánět (Martinon et al., 2002). Zatímco endogenní stimulanty jako krystaly urátu sodného, či fosforečnanu vápenatého pocházejí ze špatně fungujících, či stresu vystavených buněk, exogenní stimulanty pocházejí z patogenů (Martinon et al., 2006). Nedostatečný zánět může vést k persistentním infekcím, zatímco přehnaná zánětlivá reakce vede ke chronickým nemocem. Jak již bylo řečeno, PAMPs nebo DAMPs indukují po interakci s PRRs tvorbu cytokinů, včetně těch, které podporují zánětlivou reakci (Chen & Nuñez, 2010)\* jako IL-1, který je nadřazený ostatním interleukinům v navozování zánětlivých procesů (Dinarello, 1998). Hlavními strukturními složkami inflamazomů jsou NOD-podobné receptory (NLRs) a AIM2-podobné receptory (ALRs). Pro NLRs je typická přítomnost nukleotid-vazebné domény (NBD), která je potřebná pro

oligomerizaci a vytvoření inflamazomu, a také leucin bohaté domény (LRR), zodpovědné za inhibici inflamazomu. Zároveň NLRs mohou obsahovat pyrinovou doménu (PYD) a kaspázovou aktivační a rekrutující doménu (CARD). ALRs mají také pyrinovou doménu, avšak od NLRs se liší ve vazebné doméně HIN. NLRs a ALRs se po stimulaci oligomerizují do podpůrné struktury, jejíž hlavní funkcí je schopnost aktivace kaspázy-1 (Strowig et al., 2012)\*. Kaspáza-1 se před aktivací nachází jako prokaspáza1, ve své inaktivní formě. Po obdržení aktivačního signálu se inflamazom aktivuje. Receptory NLRs a ALRs rekrutují pro-kaspázu-1 obsahující doménu CARD, která interaguje s doménou CARD AIM/NOD-podobných receptorů, což vyúsťuje v aktivaci inflamazomu. Druhý možný způsob aktivace je pomocí pyrinové domény, či adaptérové molekuly ASC obsahující CARD i PYD (Martinon et al., 2002). Jak už bylo výše zmíněno, kaspáza-1 zároveň řídí sekreci IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  (Keller et al., 2008).

Názvy inflamazomů se odvíjí od podpůrných proteinů, kterými jsou tvořeny. Většina je složena z jednoho, či dvou NLRs, avšak jsou i inflamazomy tvořeny AIM2 a pyrinem, které neobsahují NLRs (Hornung et al., 2009). Příkladem jsou inflamazomy NLRP3, NLRC4, NLRP6 a AIM2, shrnuto v (Strowig et al., 2012). Z těchto zástupců je NLRP3 možno aktivovat nejširším spektrem stimulantů jako DAMPs, PAMPs tak i bakteriálními toxiny (Franchi et al., 2007).

Regulace inflamazomů je velmi přísně hlídána, nadprodukce cytokinů, či zvýšená frekvence buněčné smrti by totiž mohla vést k vedlejším účinkům, jako septickému šoku, kterým se chce organismus vyvarovat. Z tohoto důvodu jsou inflamazomy regulovány několika způsoby. Prvním způsobem je regulace na transkripční a post-transkripční úrovni, kde se omezuje exprese senzorů inflamazomu. Například produkce NLRP3 je ve většině buněčných typů nízká a vyžaduje aktivační signál (Strowig et al., 2012)\*. Tento signál je označován jako signál I a spadají do něj reaktivní formy kyslíku (ROS), cytokiny i mikrobiální ligandy. Alternativní sestřih inflamazomových složek vede k tvorbě nových variant s jinými vlastnostmi (Bryan et al., 2010). Dalším způsobem omezení inflamazomů je separace jednotlivých složek, tudíž nedochází k tvorbě inflamazomu, či přímou inhibicí kaspázy -1 (Bruey et al., 2007). Autofágie, jeden z procesů, který je spojen s buněčným stresem, také reguluje aktivitu inflamazomů. Při autofágii dochází k degradaci proteinových shluků a recyklaci metabolitů. Pokud autofágie neprobíhá, dochází ke snížení prahu pro aktivaci inflamazomů (Saitoh et al., 2008).

## **2.2 Interferony**

Mezi cytokiny se také řadí interferony (IFNs), podle kterých byly popsány ostatní třídy cytokinů jejich funkce, signální dráhy a receptory (Pestka et al., 1987). Interferony hrají zásadní roli v časné protivirové obraně. Zároveň poskytují hostiteli po jejich sekreci pro viry nepříznivé vnitrobuněčné podmínky zahrnující interferenci s virovou replikací a směřování dalších složek imunitního systému do místa infekce. Při virové infekci je indukována produkce IFNs v infikované buňce, ze které jsou sekretovány. Interferony sekretované z infikované buňky svou aktivitou vytváří komunikační síť mezi

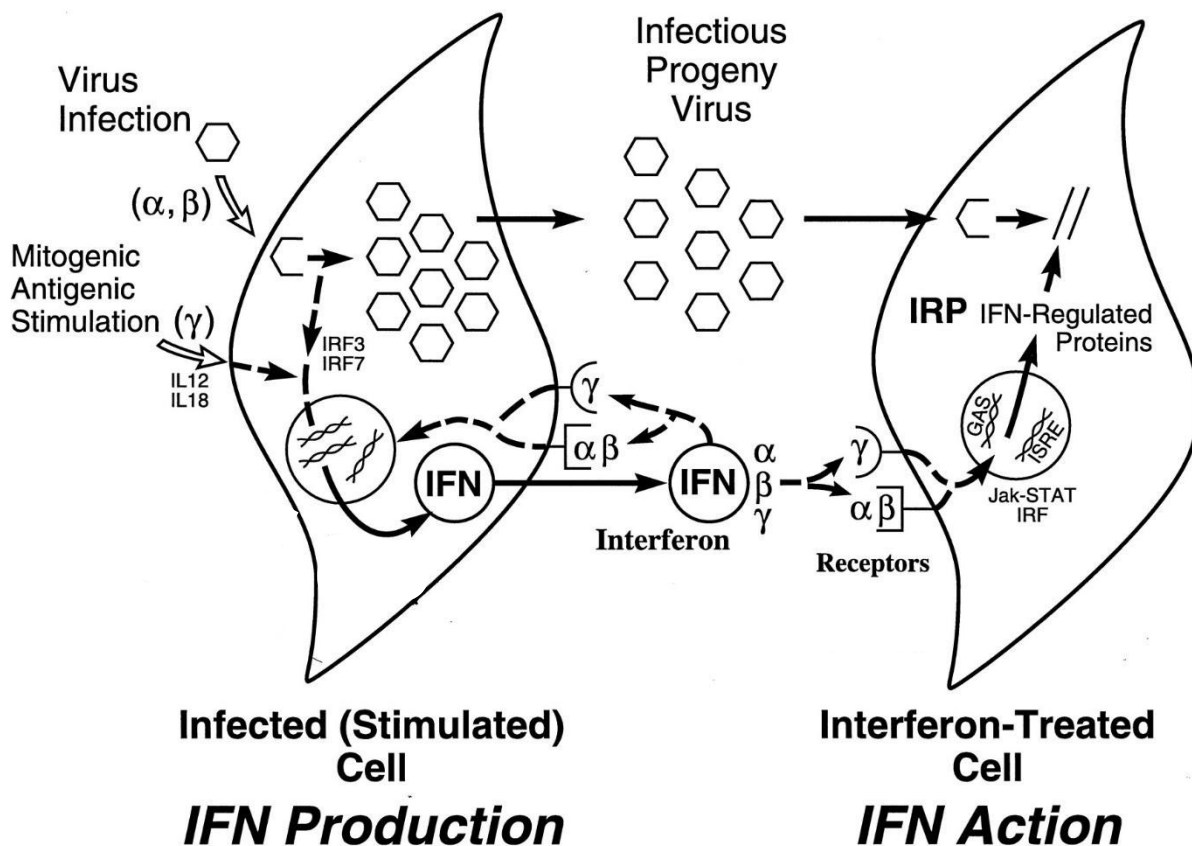
ostatními sousedícími buňkami vyúsťující v indukci genů stimulovaných interferony (ISGs), jejichž primární funkcí je navození dalších proti-virových stavů, které budou společně s ISGs vysvětleny podrobněji níže (Pestka et al., 2004)\*. Interferony se dělí do tří hlavních skupin: Typ I, Typ II, Typ III.

Do prvního typu se řadí 7 tříd IFN:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\omega$ ,  $\delta$ , a  $\tau$ . Tyto interferony jsou tvořeny většinou buněk lidského těla. Společným prvkem interferonů Typu I je jejich receptor IFNAR tvořený dvěma řetězci IFNAR1/2, který po navázání interferonu aktivuje Janusovy kinázy (JAKs) typu Jak1 a tyrosin kinázy 2 (TYK2) a následně signalizace vedoucí až k produkci ISGs (Pestka et al., 2004)\*.

Typ II interferonů je zastoupen pouze jedním druhem – IFN- $\gamma$ , který je produkován aktivovanými buňkami imunitního systému, NK buňkami a T-lymfocyty (Gray et al., 1982). IFNs- $\gamma$  jsou tvořeny T-lymfocyty v případě, že detekují mitogen, nebo jsou stimulováni antigenem (Ortaldo et al., 1983). Na rozdíl od IFNs I se IFNs II váží na svůj vlastní receptor IFNGR, který jako u Typu I je složený ze dvou řetězců a slouží k aktivaci kináz a indukci signalizace.

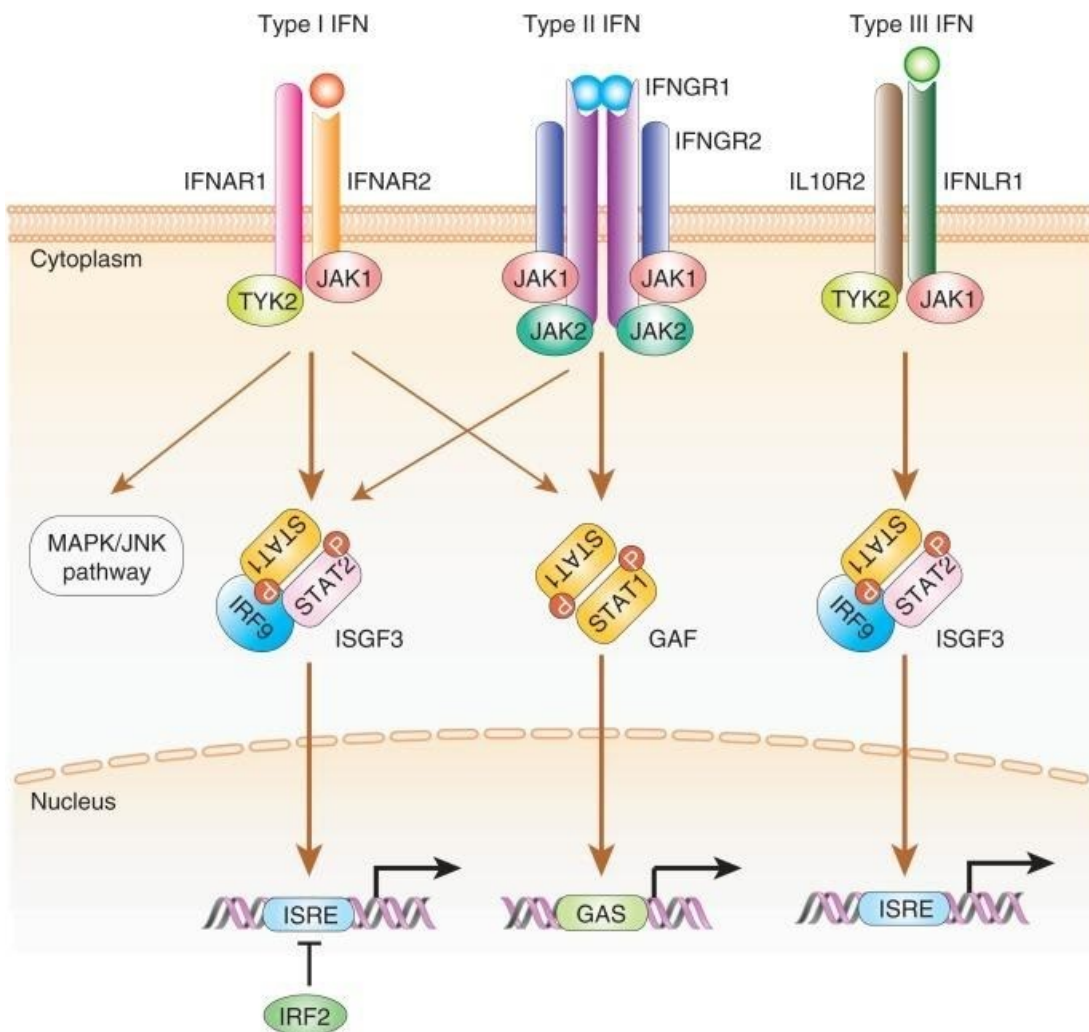
Třetím typem jsou nejméně charakterizované interferony, které byly dříve považovány za interleukiny. Svou produkcí jsou vázáni zejména na epiteliální povrchy. Jejich druhé označení je IFN- $\lambda$ , pod které spadají IFN- $\lambda$ 1 (IL-28A), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28B), IFN- $\lambda$ 3 (IL-29). Tyto interferony jsou svojí strukturou příbuzné IFN Typu I a interleukinu 10, se kterými sdílejí i část svého receptoru. Stejně jako u předešlých typů interferonů, i zde dochází k signalizaci zprostředkované kinázami (Sheppard et al., 2003).

Při infekci, následné transkripci genu pro IFNs a translaci jsou IFNs sekretovány ven z buňky. Jak můžeme vidět na Obr.2, IFNs se parakrinně přenáší k sousedícím buňkám, kde jsou rozpoznány interferonovým receptorem. Z tohoto receptoru je aktivována signální dráha JAK/STAT vedoucí přes aktivaci Janusovy kinázy (JAK) a následně signálního transduktoru a aktivátoru transkripce (STAT) k indukci transkripce ISGs a produkce interferony regulovaných proteinů (Pestka et al., 2004)\*.



**Obr. 2:** Schématické zobrazení indukce a sekrece IFN. Buňka vlevo produkuje IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  jako odpověď na infekci virem a IFN- $\gamma$  po stimulaci antigenem, či mitogenem. Mezi buňkou tvořící IFN a sousedícími buňkami dochází k parakrinnímu přenosu. Napravo je buňka, ve které IFN vázaný na receptor na jejím povrchu spouští dráhu signální transdukce vedoucí k syntéze interferony regulovaných proteinů, které navodí antivirové prostředí uvnitř buňky, vedoucí k inhibici replikace viru. Upraveno podle (Pestka et al., 1983).

Mezi kinázy aktivované vazbou interferonu na receptor IFNAR patří JAK4 a TYK2, jejichž funkce spočívá ve fosforylaci STAT1 a STAT2, které formují trimerní komplex IFN-stimulovaný genový faktor 3 (ISGF3), složený ze STAT1/2 a IRF9 (Obr. 3) (Haque & Williams, 1994). ISGF3 je transkripční faktor, který se po translokaci do jádra váže na ISRE oblasti genů stimulovaných interferony, čímž zahajuje jejich transkripci. Jaderný interferonový regulační faktor 2 slouží jako negativní regulátor transkripce aktivované ISGF3, tudíž jeho nepřítomnost vyúsťuje v masivní produkci IFN Typu I (Hida et al., 2000). U signalizace IFN- $\gamma$  dochází k homodimerizaci STAT1, po čemž dochází k navázání na jaderný GAS ( $\gamma$ -aktivovaná sekvence) a následné indukci ISGs, podobně jako u ostatních typů IFNs (Petricoin et al., 1994). Jak/STAT signální dráha také indukuje produkci IRF7, který zesiluje transkripční odpovědi na virovou infekci indukcí exprese jiných genů pro IFN- $\alpha$ , které nejsou indukovány v prvotně infikované buňce (Marié et al., 1998).



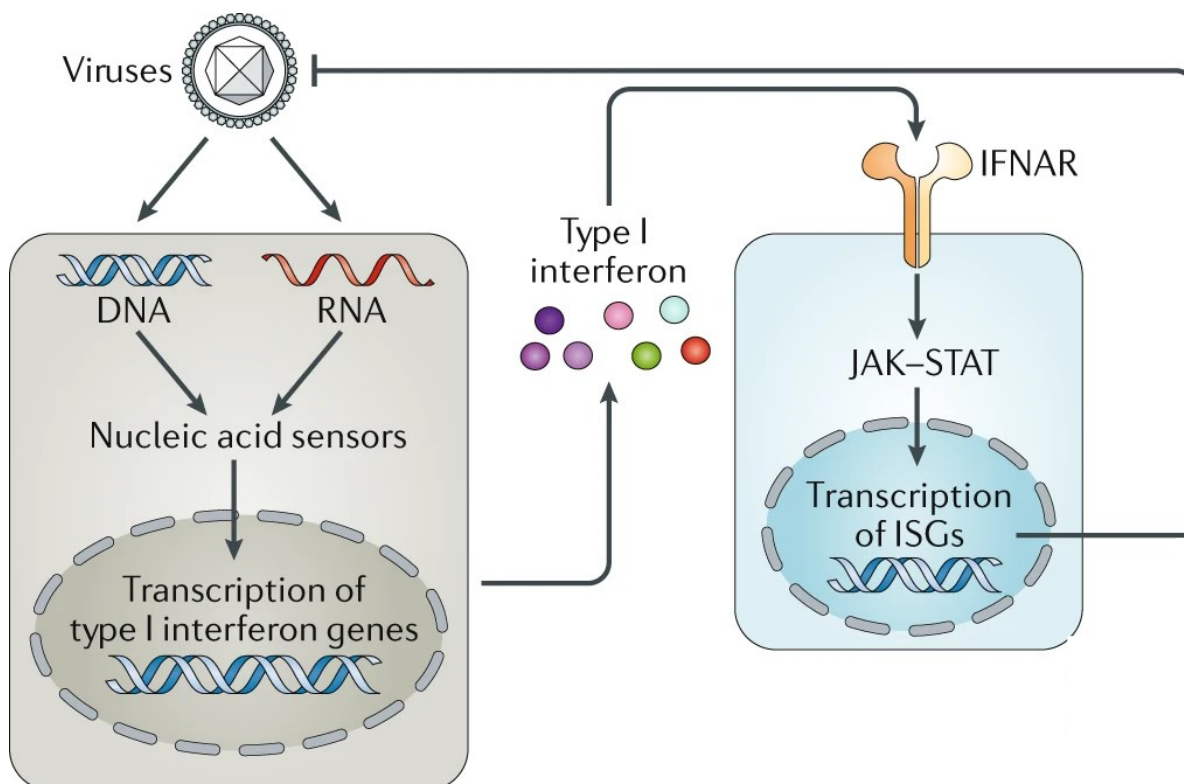
**Obr. 3:** Schéma signální transdukce indukované IFNs typu I, II, III po navázání na jejich receptory. Typ I se váže na povrchový receptor IFNAR2, který následně interaguje s IFNAR1 a dochází k aktivaci kináz TYK2 a JAK1, které se vážou na cytoplazmatické části receptoru. Kinázy poté fosforylují STAT1 a STAT2, což umožňuje navázání IRF9 a následné složení heterotrimerního komplexu ISGF3. Homodimerizace STAT1 vede k formaci GAF ( $\gamma$ -asociovaný faktor). Oba tyto faktory translokují do jádra, kde ISGF3 indukuje expresi ISGs přes ISRE, zatímco GAF přes GAS sekvenci. V jádře se nachází IRF2, který inhibuje expresi indukovanou ISGF3. IFN typu I zároveň může indukovat signální dráhu vedoucí přes mitogenově asociovanou protein kinázu (MAPK), či přes kinázu JNK. Druhý typ interferonů se váže na receptor IFNGR1 homodimer. Poté se připojí podjednotky IFNGR2. Napojení IFNGR1/2 vede k prvotní fosforylaci JAK1, JAK2 a druhotné fosforylaci STAT1 který tvoří homodimer GAF. Interferony  $\gamma$  také aktivují ISGF3, avšak síla aktivace je v poměru s IFN Typu I slabá. Interferony  $\lambda$  se váží na receptor IFNLR1, který podobně jako u IFN- $\alpha$  rekrutuje svoji druhou podjednotku, avšak v tomto případě to je IL10R2. Následně dochází k aktivaci TYK2 a JAK1 kináz, fosforylaci STAT1 a STAT2, připojením IRF9, formaci komplexu ISGF3 a jeho translokaci do jádra a indukci ISGs z ISRE sekvence IRF2 (Negishi et al., 2018).

Existují dva typy IFN stimulovaných genů podle toho, v jaké fázi infekce jsou aktivovány, avšak společnou funkcí jejich produktů je navodit vnitrobuněčný proti virový stav, který vede až k smrti

interferony stimulované buňky, aby se zabránilo šíření virové infekce do okolí. ISGs rané fáze zahrnují: *ISG15/56*, interferonem stimulovaný gen rané fáze (*RANTES*), indukovatelnou syntázu oxidu dusnatého (*INOS*) a hlavní histokompatibilní komplex I (*MHC I*). Funkce produktů těchto genů se liší, *INOS* má antibakteriální charakter svou produkcí oxidu dusnatého, *ISG56* zamezuje translaci mRNA interakcí s p48 podjednotkou elongačního iniciačního faktoru 3 (*elf3*) a *MHC I* vystavuje antigenní peptidy na svůj povrch pro rozpoznání  $T_H$  buňkami. Mezi takzvané ISGs opožděné fáze patří geny pro dsRNA aktivovanou kinázu (*PKR*), 2'-5'oligoadenylát syntázu (*OAS*), RNáza L a *IRF7*. RNáza L i 2'-5'OAS degradují RNA (Grandvaux et al., 2002)\*, zatímco *PKR* a *IRF3* hrají roli v buněčné smrti a zastavení proteosyntézy. Fosforylace jaderného *IRF3* vede k jeho konformační změně, která je nutná pro interakci s pro-apoptickým proteinem *Bax*. Komplex *IRF3*-*Bax* translokuje do mitochondrie, kde aktivuje kaspázu 9 a snižuje uvolnění cytochromu c do cytosolu, což vede k buněčné smrti (Chattopadhyay et al., 2010).

### 3. Rozpoznání nukleových kyselin

Molekulární motivy spojené s patogeny (PAMPs) zahrnují části buněčné stěny jako lipopolysacharidy, peptidoglykany, glykany, ale i bakteriální proteiny typu flagelin. Pro rozpoznávání virů jsou důležité PAMPs ve formě nukleové kyseliny DNA a RNA (Hayashi et al., 2001). Rozpoznání exogenních nukleových kyselin při virových infekcích je klíčové pro indukci IFN typu I v infikovaných buňkách a navození proti-virového prostředí v buňkách okolních (Obr. 3). Z tohoto důvodu se evolučně vyvinuly senzory exogenních nukleových kyselin RNA a DNA (Obr. 4) (Janeway, 1989).



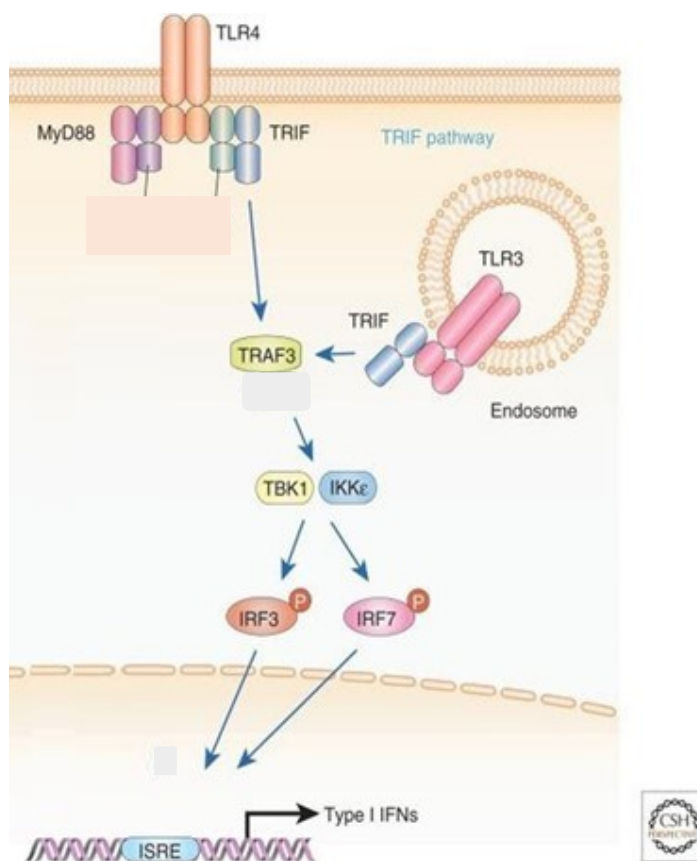


**Obr. 4:** Schéma navození protivirového prostředí senzory nukleových kyselin. Senzory nukleových rozpoznávají DNA nebo RNA virových genomů. To vede k aktivaci vnitrobuněčných signalizačních drah, jejímž výsledkem je spuštěná transkripce genů kódujících IFNs typu I, které se po sekreci z buňky vážou, na IFNAR, čímž je aktivována signální dráha JAK – STAT vedoucí k expresi interferonem stimulovaných genů. Upraveno podle (Rehwinkel & Gack, 2020).

### 3.1 RNA senzory

Do této skupiny spadají některé z takzvaných Toll-like receptorů, které se dají rozdělit do více poddruhů. Pro tuto kapitolu jsou důležité TLR3 a TLR4, které se vyskytují na povrchu buněčné membrány, či v endozomech. Endozomální TLR3 rozpoznává virovou dsRNA a také vlastní RNA pocházející z mrtvých buněk (Alexopoulou et al., 2001). Na povrchu buňky se nachází TLR4, kde detekuje bakteriální PAMPs i DAMPs z mrtvých buněk (Takeuchi et al., 1999). Detekce TLR3 a TLR4 vede k signální dráze TRIF-TANK-IRF3 (Fitzgerald et al., 2003).

Při rozpoznání ligandu Toll-like receptory 3 a 4 dochází k mobilizaci adaptérového proteinu aktivujícího interferonové regulační faktory (MyD88) (Medzhitov et al., 1998) a adaptérové domény aktivující interferonové regulační faktory (TRIF) (Yamamoto et al., 2003), které dále aktivují interferonové regulační faktory (IRFs) a transkripční faktory. Tyto regulační faktory vykonávají svoji roli v regulaci genové exprese vyvolané přítomností interferonů. Všechny IRFs mají DNA-vazebnou doménu (DBD) rozpoznávající interferony stimulovaný reakční element (ISRE), který je přítomen v promotorech genů pro IFN I, IFN III, a ISGs (Tanaka et al., 1993). Jak můžeme vidět na Obr.5, TLR4 indukuje expresi IFN I skrze TRIF-TANK-IRF3 (TNF receptor-associated factor [TRAF]-associated nuclear factor [NF]- $\kappa$ B activator) [TANK] -binding kinase 1 (TBK1) – IRF3 signální dráhu (Fitzgerald et al., 2003). Posléze dochází k fosforylaci TRIF, který rekrutuje signální molekuly TRAF3 a TBK1, jejichž role spočívá ve fosforylaci, dimerizaci a jaderné translokaci IRF3, což vede k expresi IFN I (Hemmi et al., 2004).

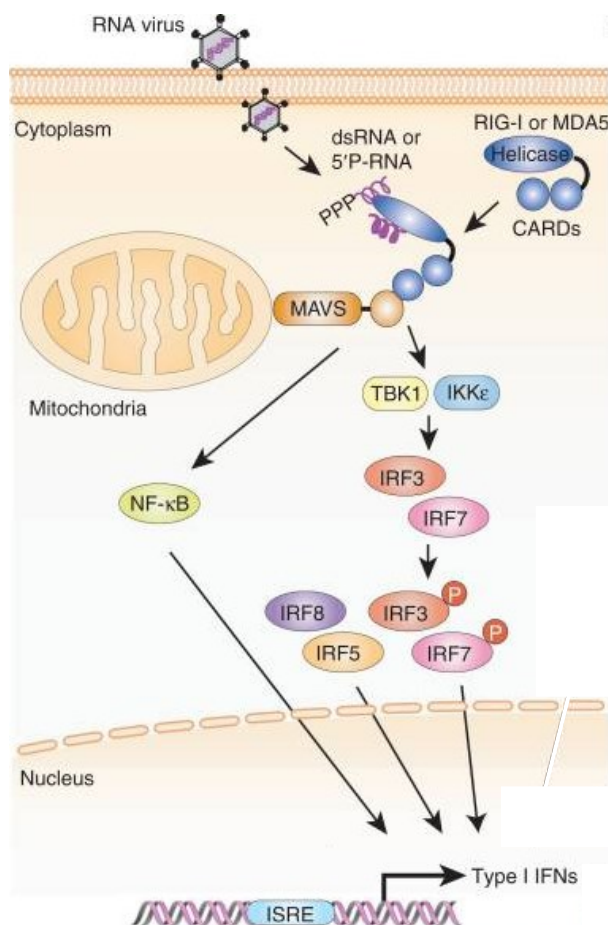


**Obr. 5:** Schéma indukce IFN typu I po detekci PAMPs Toll-like receptory a následnou signalizací IRFs. Přítomnost RNA bez 5'koncové čepičky, či DNA v cytosolu je detekována PRRs, v tomto případě TLR3 a TLR4. Vzájemná interakce receptoru s adaptérovými molekulami MyD88 a TRIF vede k aktivaci TRAF, TBK1 a inhibitoru NF- $\kappa$ B kinázové podjednotky  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ). Fosforylace IRF3 a IRF7 je závislá na činnosti aktivované TBK1. Fosforylované IRFs se poté translokují do jádra a indukují IFN typu I. Upraveno podle (Negishi et al., 2018).

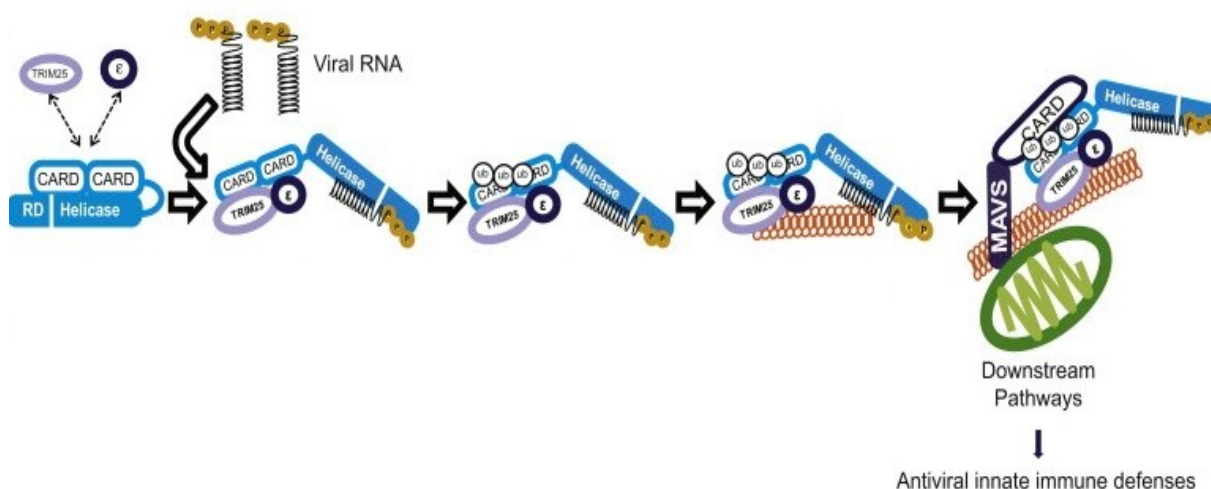
Obecně lze považovat RNA senzory za PRRs. Dalšími důležitými senzory jsou RIG-podobných receptorů (RLRs) (Yoneyama et al., 2004) zahrnující tři typy cytosolických sensorů: gen I indukovaný retinovou kyselinou (RIG-I) a senzory pod zkratkami MDA5 a LGP2. Společným prvkem těchto sensorů je přítomnost C-koncové domény zvané represorová doména (RD) a DExD/H-box helikázové domény. LGP2 se od RIG-I a MDA5 odlišuje absencí domény CARD, která se vyskytuje na N konci molekul RIG1 a MDA5 a slouží k signalizaci (Yoneyama et al., 2005). Ve většině buněk lidského těla je v malé míře stále exprimován RIG-I a jeho hladina se zvyšuje v závislosti na množství IFNs. V klidovém stádiu jsou CARD domény navzájem překryty (Kowalinski et al., 2011) a RD blokuje helikázovou i RNA-vázající doménu (Saito et al., 2006). RIG-I rozpoznává různé formy ligandů, které všechny spadají do PAMP RNA kategorie. Specifita je dána délkou jedno vláknové, či dvou vláknové RNA, sekvencí a přítomností 5'trifosfátu. RNA vlákno obsahující čepičku na svém 5'konci, či vlákno, u kterého 5'trifosfát chybí

nevyvolá signální reakci (Hornung et al., 2006). Ostatní sekundární struktury RNA jako smyčka, bulge (vnitřní vyboulčina) či „panhandle“ struktura jsou rozpoznány senzorem za podmínky přítomnosti 5'koncového trifosfátu a tupého 5'konce (Marq et al., 2010). RIG-I má také schopnost detekovat specifické virové sekvence jako například poly-U/UC motiv vyskytující se v genomu hepatitidy C (Saito et al., 2008), či mRNA nukleokapsidového genu N u viru Hantaan (Lee et al., 2011).

Při detekci RNA senzory MDA5, či RIG-I dochází k jejich aktivaci a následně k interakci domény CARD sensorů s CARD mitochondriálního aktivátoru virové signalizace (MAVS), klíčového adaptérového proteinu všech RLRs, známého pod synonymy IPS-1, VISA, či Cardif (Kawai et al., 2005). Po rozpoznání PAMP RNA a hydrolýze ATP dochází k translukaci RIG-I podél RNA, čímž umožňuje oligomerizaci dalších RIG-I na dané RNA (Patel et al., 2013). Jak můžeme vidět na Obr.6, CARD-CARD interakce vede ke spuštění signální kaskády, která zahrnuje aktivaci TANK-vazebné kinázy 1 (TBK1) a IKKε. Tyto kinázy následně fosforylují a tím spouští transkripční faktory IRF3 a NF-κB (Fitzgerald et al., 2003), které, jak již bylo zmíněno výše, jsou zodpovědné za transkripci interferonů. Jelikož CARD-CARD interakce tvoří tetramery v přítomnosti ubiquitinu, dochází k ubiquitinylaci N konce RIG-I pomocí proteinu TRIM25 (Gack et al., 2008). Takto vytvořený komplex, zobrazený na Obr.7, se poté přesune z cytoplazmy do membrány asociované s mitochondrií (MAM) pomocí ochranného proteinu 14-3-3ε (Liu et al., 2012), na které po sléze dochází k interakci MAVS CARD a RIG-I CARD vyúsťující v TBK1 a IKKε signalizaci (Hou et al., 2011).



**Obr. 6:** Schématické zobrazení indukce IFN Typu I po rozpoznání senzory RIG-I a MDA5. Při detekci virové RNA RIG-I, či MDA5 dochází k jejich aktivaci. Aktivované receptory svou CARD interagují s CARD adaptérového proteinu MAVS na mitochondriální membráně. Tato interakce je aktivačním signálem pro TBK1 a IKKε, které dále fosforylují IRF3 a IRF7, jež se následně translokují do jádra a indukují expresi IFNs Typu I. Adaptérový protein rovněž aktivuje NF-κB, který se stejně jako IRFs jaderně translokuje a iniciuje interferony Typu I. Upraveno podle (Negishi et al., 2018).



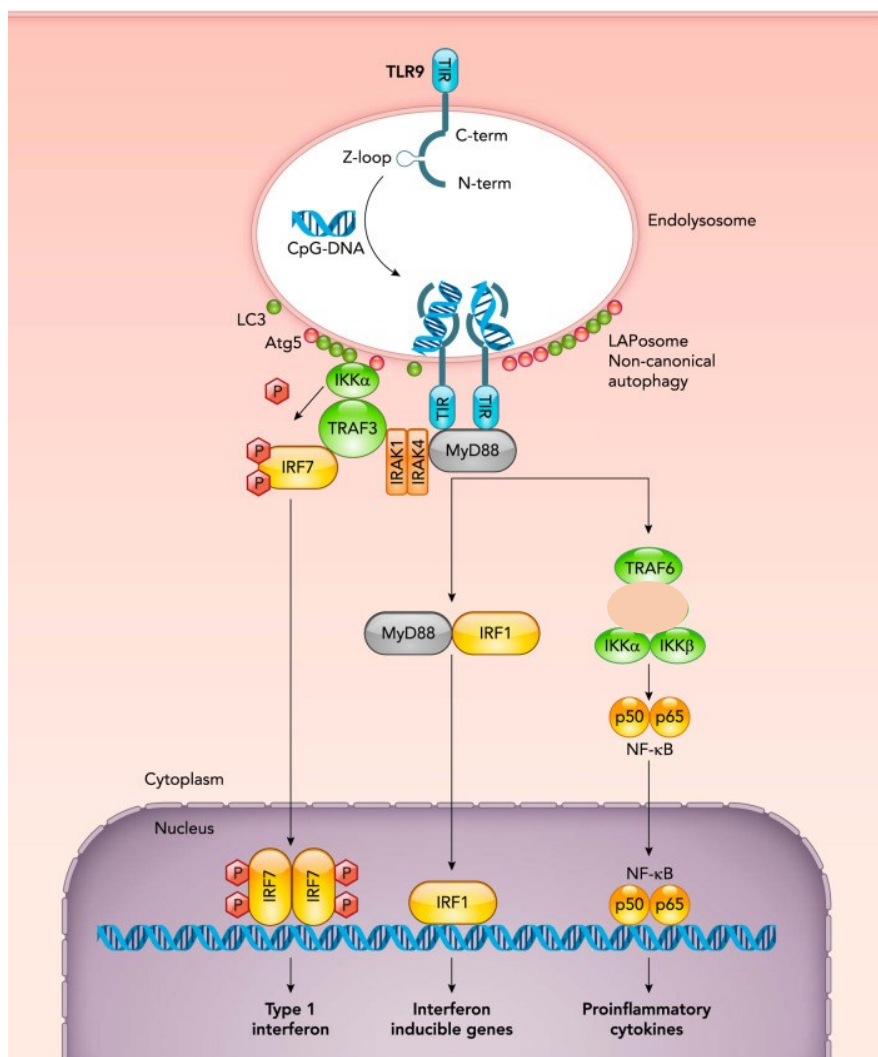
**Obr. 7:** Schéma translokace RI-I komplexu do membrány asociované s mitochondrií pomocí ochranného proteinu 14-3-3ε. Popis schématu je postupně zleva doprava. RIG-I v klidovém stavu přechodně interaguje s TRIM25 a 14-3-3ε a při navázání virové RNA dochází ke konformační změně. Následuje ubiquitinylace domény CARD pomocí TRIM25, což stabilizuje celý komplex, který je translokován do MAM, po čemž dochází k imunitním reakcím. Upraveno podle (Liu et al., 2012).

### 3.2. DNA Senzory

Jak je známo, v deoxyribonukleové kyselině je uložena genetická informace širokého spektra organismů a mikroorganismů, včetně mnohých virů. Přirozeným výskytem DNA živočišné buňky jsou jádro a mitochondrie. Tudíž zaznamenání její přítomnosti v jiných lokalitách buňky jako cytosol, nebo endozom vede k vyvolání imunitních odpovědí. Nepřirozený výskyt DNA může být způsoben infekcí patogeny, poškozenou schopností buňky metabolizovat exogenní DNA v lyzozomech, či neschopnost buňky kontrolovat endogenní DNA produkty. S těmito jevy se pojí DNázy. Enzym DNáza II se vyskytuje v lyzozomech, ve kterých je zodpovědný za štěpení DNA, čímž efektivně redukuje množství endogenní a exogenní DNA v buňce. Buňky s nulovou aktivitou této DNázy vykazují únik DNA z lyzozomu do cytoplazmy, což vyúsťuje zvýšenou signalizací DNA senzorů (Okabe et al., 2005). Druhou známou DNázou je TREX1, která se na rozdíl od DNázy II vyskytuje v cytosolu v blízkosti endoplazmatického retikula. TREX1 deficientní buňky vykazují nahromadění vedlejších produktů replikace a DNA

endogenních retrovirů v cytoplazmě (Stetson et al., 2008). Imunostimulační role DNA spočívá v navození proti virového prostředí jak uvnitř infikovaných buněk, tak u buněk sousedních. Stejně jako tomu je u RNA, detekce DNA vede k produkci IFNs typu I (Ishii et al., 2006), avšak senzory a s nimi spojené signální dráhy se liší. Struktura DNA je velmi důležitá pro rozpoznání senzory. Do těchto struktur patří nemethylovaná DNA bohatá na cytosin-fosfát-guanosin (CpG), která se vyskytuje ve velké míře napříč patogeny, avšak u savců se nachází v methylované formě, a tudíž nemá imunostimulační účinky (Hemmi et al., 2000). Druhým typem rozpoznávané struktury je B-DNA, nejčastější přirozená forma výskytu dsDNA, která se hojně vyskytuje ve virech, v bakteriích a savcích. Méně častá Z-DNA má také imunostimulační účinky, avšak oproti B-DNA jsou zanedbatelné (Ishii et al., 2006). Sekvenčně specifická ssDNA a dsDNA obsahující smyčky obohacené o thymin a adenin také indukují produkci IFNs typu I, ale nejsou rozpoznávány žádným typem doposud definovaných DNA senzorů (Sharma et al., 2011). DNA senzory se nacházejí v cytoplazmě, endozomech a překvapivě i v buněčném jádře.

Prvním popsáním DNA senzorem byl TLR9, který rozpoznává CpG DNA a je to zatím jediný DNA senzor nacházející se v endozomech (Hemmi et al., 2000). V člověku je výhradně exprimován v subtypu 2 dendritických buněk (DC 2) (Kadowaki et al., 2001). Jak je zobrazeno na Obr. 8, signalizace probíhá dimerizací TLR9 po navázání CpG DNA, což vede k rekrutování MyD88 na endolyzozomální membránu pomocí TIR domén (Latz et al., 2007). Následně vzniká TLR9-MyD88 komplex, který aktivuje NF- $\kappa$ B a translokuje IRF1 do jádra, čímž dochází k expresi IFNs typu I, ISGs a pro-zánětlivých cytokinů (Negishi et al., 2006). TLR9 má také roli v interakci se systémem autofágie. Při stimulaci CpG DNA se autofagický protein LC3 a kináza IKK $\alpha$  vážou na endozom obsahující TLR9. Tato asociace je zajišťována nekanonickým procesem zvaným autofágie spojená s proteinem LC3 (LAP), který probíhá za přítomnosti autofagického proteinu (ATG5). Komplex LC3/IKK $\alpha$  dále interaguje s TRAF3 a IRF7, což posléze vede k indukci IFNs typu I (Hayashi et al., 2018).



**Obr. 8:** Schéma signalizace receptorem TLR9 a následná indukce IFNs Typu I. Endolyzozomální LRR doména složená z N a C konce slouží k rozpoznání CpG DNA. Po rozpoznání ligandu dochází k dimerizaci TLR9 a následně TIR domény rekrutují adaptérový protein MyD88. Dále dochází k vytvoření komplexu signálních molekul IRAK4, IRAK1, TRAF3 a IKK $\alpha$ , se kterým interaguje LC3/IKK $\alpha$  zprostředkovaný protein ATG5. Toto vede k indukci interferonů prvního typu. K indukci ISGs dochází po interakci MyD88 s IRF1 a následnou translokací do jádra. Aktivace TLR9 také vede v spuštění NF- $\kappa$ B signální dráhy, která vyúsťuje v produkci pro-zánětlivých cytokinů. Upraveno podle (Briard et al., 2020).

DNA senzorů nacházejících se v cytosolu bylo popsáno nejméně jedenáct: aktivátor interferonů závislý na DNA (**DAI**) interaguje po navázání na dsDNA s TBK1 a IRF3, což dále vede k indukci IFNs typu I. Podobně jako u TLR9, i u DAI signalizace dochází k aktivaci NF- $\kappa$ B (Takaoka et al., 2007). Pozdější studie ovšem tyto poznatky vyvracejí, jelikož v buňkách, či myších neobsahujících DAI dochází k produkci IFNs a zánětlivých cytokinů, tudíž role DAI jako DNA senzoru není zcela jasná (Ishii et al., 2008). **RNA polymeráza III** je cytosolický senzor, který rozpoznává sekvence dsDNA bohaté na thymin a adenin, ze kterých následně syntetizuje 5' trifosfát dsRNA, jež je dále detekována RIG-1 a následuje signalizace k indukci interferonů I typu (Ablasser et al., 2009). Dalším DNA senzorem je protein bohatý na leucinové repeticity (**LRRFIP1**), který rozpoznává v cytosolu jak dsRNA, tak dsDNA a

indukuje produkci IFNs typu 1 přes dráhu závislou na catenininu  $\beta$  (Yang et al., 2010). Mezi další cytosolické DNA senzory patří DNA dependentní protein kináza (**DNA-PK**), která se vyskytuje v mnoha buněčných typech, avšak ve fibroblastech je jejich zastoupení vyšší (Ferguson et al., 2012). Tento enzym má roli v jádře, kde opravuje dvouvláknové DNA zlomy nehomologním spojováním konců, kdy DNA-PK tvoří komplex s nukleázou Artemis. Tento komplex má poté funkci endonukleázy a dochází k zastřižení 5' a 3' DNA konců (Ma et al., 2002). Senzorovou funkci vykonává v cytoplazmě, kde signalizuje indukci interferonů typu I přes aktivaci IRF3 (Ferguson et al., 2012). S aktivací IRF3 se pojí i další DNA senzor, meiotický rekombinační homolog 11 A (**MRE11**), který v cytosolu velkého spektra buněk rozpoznává exogenní dsDNA. Vazebný protein RAD50 se po rozpoznání DNA proteinem MRE11 translokují z jádra do cytoplazmy a společně s MRE11 tvoří komplex, který interaguje se stimulatorem interferonem podmíněných genů (STING), který bude vysvětlen níže. Tato interakce vede k spuštění STING-TBK1-IRF3 signální dráhy a produkci interferonů typu I (Kondo et al., 2013). **RNA helikázy** tvoří skupinu cytosolických DNA senzorů v plazmacytoidních dendritických buňkách a dělí se na dva poddruhy: DEAH-box helikázy (DHX) a DEAD-BOX helikázy (DDX) (Abdelhaleem et al., 2003). **Helikázy DHX9 a DHX36** detekují cytosolickou nemethylovanou CpG DNA, avšak jejich funkce se mírně liší. DHX9 spouští produkci IL-6, TNF- $\alpha$ , zatímco DHX36 vede k indukci IFN- $\alpha$  skrze translokaci IRF7 (Kim et al., 2010). Novější studie ovšem poukazují na novou roli DHX9 jako jaderného transkripčního koaktivátoru NF- $\kappa$ B, spíše než senzoru. Vyřazení genu pro DHX9 v makrofázích a myších fibroblastech vede ke snížené sekreci cytokinů podmíněných NF- $\kappa$ B, avšak nikoliv k sekreci nulové. Kontrastně, při zvýšené expresi DHX9 je sekrece vyšší, než za běžných podmínek (Ng et al., 2018). Do DDX poddruhu náleží helikáza **DDX41**, která v myeloidních dendritických buňkách detekuje dsDNA v B formě. Po detekci dochází k interakci se STING skrze DEADc vazebnou doménu, jež spouští TBK1-IRF3 signální dráhu a NF- $\kappa$ B (Zhang et al., 2011). Kromě DNA je DDX41 schopna rozpoznat i bakteriální cyklický di-GMP (c-di-GMP) (Parvatiyar et al., 2012), který je podobný dinukleotidu cGAMP, který je produkován dalším cytosolickým DNA senzorem cGAMP syntázou (**cGAS**), a který aktivuje signální dráhu vedoucí přes STING (Sun et al., 2013). Dalšími popsány DNA senzory jsou AIM2-podobné receptory (ALRs) typu AIM2. **AIM2** je cytosolický dsDNA senzor, který, jak už bylo zmíněno dříve, tvoří inflamazomový komplex a aktivuje kaspázu 1 v odpovědi na virovou infekci, což vede k produkci IL-1 $\beta$  a buněčné smrti (Hornung et al., 2009). Do skupiny ALRs patří také DNA senzory: interferonem  $\gamma$  indukovatelný protein 16 (**IFI16**) (Unterholzner et al., 2010) a interferonem indukovatelný protein X (**IFIX**) (Diner et al., 2015). Pro rozpoznání genomů virů a indukci IFNs se v mnohých studiích ukázaly nejvýznamnějšími senzory cGAS a IFI16. Proto jim budou věnovány samostatné kapitoly. Signalizační dráhy aktivované těmito i mnohými jinými DNA senzory vedou přes aktivaci proteinu STING, jímž se bude zabývat následující podkapitola.

### 3.3. STING

Stimulátor interferonem indukovaných genů (STING) je hlavní adaptérovou molekulou DNA signalizace po rozpoznání DNA. Jelikož zprostředkovává kontakt mezi DNA senzory a signalizačními molekulami jako je kináza TBK1 a regulační faktor IRF3, které vedou k indukci IFNs typu I (Ishikawa & Barber, 2008). STING se vyskytuje v mnoha buněčných typech, mezi které patří fibroblasty, makrofágy a dendritické buňky, ve kterých byla i pozorována jeho funkce (Ishikawa et al., 2009). Transmembránový STING se v klidovém stádiu nachází na endoplazmatickém retikulu (ER), kde je navázaný s TRAP $\beta$ , proteinem spadajícím do skupiny proteinů asociovaných s translokou (TRAP) a translokou podjednotkou SEC61 $\beta$ . Absence TRAP $\beta$  a SEC61 $\beta$  vede k narušení schopnosti STING indukovat produkci interferonů typu I (Ishikawa & Barber, 2008).

Aktivace STING souvisí s detekcí cyklických dinukleotidů (CDNs), které STING detekuje přímo a stává se tudíž jejich senzorem. Rozpoznání CDNs, konkrétně bakteriálního c-di-GMP, je uskutečněno STING C-koncovou doménou (CTD). Mutace CTD vede k neschopnosti rozpoznání CDNs a celkovému utlumení signální dráhy vedoucí k indukci interferonů prvního typu (Burdette et al., 2011). Mezi další cyklické dinukleotidy náleží i cyklický guanosin monofosfát-adenosin monofosfát (cGAMP), který je produkován cGAMP syntázou (cGAS) (Sun et al., 2013). Indukce signalizační dráhy probíhá dvěma způsoby, které jsou zde stručně shrnuty, avšak budou rozvedeny do detailu v následující kapitole. Kanonická dráha je zahájena rekrutováním a následnou aktivací TBK1 na ER, což je zprostředkováno komplexem vzniklým z translokou a exocystu, proteinového komplexu, který hraje roli v vezikulárním transportu (Ishikawa & Barber, 2008). Exocyst s navázaným STING a TBK1 se dále translokuje do endozomů pomocí signalizačního kompartmentu mezi ER a Golgiho aparátem (ERGIC) (Gui et al., 2019) a TBK1 fosforyluje IRF3, což vede k indukci IFNs typu I (Ishikawa et al., 2009).

Existuje mnoho způsobů, jimiž jak DNA, tak i RNA viry unikají před signálními drahami spojenými se STING a s cGAS, vzhledem k jejich důležitosti v signalizaci nukleových kyselin DNA.

DNA viry, mezi něž patří herpesviry jako virus Kaposiho sarkomu (KSHV), virus Epstein-Barrové (EBV) a herpes simplex virus 1 (HSV-1), si vyvinuly mechanismy proti zachycení cGAS-STING signalizační dráhou. Herpesvirový protein tegumentu, produkt ORF52 je produkován jak KSHV, tak EBV a interaguje s virovou DNA, čímž zamezuje rozpoznání cGAS, avšak při vyšších koncentracích virové DNA v cytoplazmě se cGAS aktivuje, jelikož má vyšší afinitu pro vazbu na DNA než produkt ORF52. Z tohoto důvodu má protein ORF52 schopnost tlumit enzymatickou aktivitu cGAS, což vede k omezené produkci cGAMP a nedochází k signalizaci (Wu et al., 2015). Podobnou funkci má i latentní jaderný antigen (LANA), který se v lytické fázi infekce KSHV vyskytuje v cytoplazmě a inhibuje produkci cGAMP (Zhang et al., 2016). Herpes simplex virus 1 kóduje protein ICP27, který se v lidských makrofázích váže na komplex STING-TBK1, v důsledku čehož nedochází k fosforylaci IRF3 a dále k indukci interferonů typu I



(Christensen et al., 2016). S interferencí STING se pojí i polymeráza viru hepatitidy B, která se pomocí svých dvou domén hrajících roli při reverzní transkripci a štěpení RNA, váže na STING a zamezuje jeho ubiquitylaci (Liu et al., 2015), post-translační modifikaci umožňující produkci interferonů typu I (Zhang et al., 2012).

#### 4. cGAS

První studie popsaly cGAMP syntázu (cGAS) jako cytosolický senzor, který detekuje patogenní i hostitelskou DNA. Jak už bylo zmíněno, cGAS následně tvoří signální molekulu cGAMP, jež slouží k aktivaci adaptérové molekuly STING a spuštění rozsáhlé signální dráhy cGAS-STING. Tato signální dráha, která je přítomná v širokém spektru buněčných typů, vyúsťuje aktivací IRF3 a indukci IFNs typu I (Sun et al., 2013).

Novější studie ovšem ukazují, že tento senzor se v mnohých buňkách nachází v jádře a na cytoplazmatické membráně. Jedna z těchto studií poukazuje na hlavní místo výskytu cGAS na cytoplazmatické membráně v klidovém stádiu fagocytických buněk typu makrofágů derivovaných z kostní dřeně (BMDMs) a monocytů THP1. Ostatní buněčné typy jako L929 a HeLa vykazují lokalizaci smíšenou – jadernou u L929, heterogenní u HeLa, avšak oba typy mají mírné zastoupení cGAS v cytoplazmatické membráně (Barnett et al., 2019). C i N konce cGAS jsou důležité pro detekci DNA a samotnou aktivaci. Na C konci se vyskytuje doména Mab21 (Male abnormal 21), jejíž absence vede k neschopnosti aktivovat IRF3 a interferony typu I (Sun et al., 2013). Ukotvení cGAS na cytoplazmatické membráně má význam v rozlišování mezi endogenní a exogenní DNA. Barnett a spolupracovníci zjistili, že spojení cGAS s membránou je způsobeno tím, že jeho N-konec váže membránové fosfolipidy – fosfoinositidy jako například fosfatidylinositol difosfát (PI[4,5]P2). Upravili tedy monocyty THP1, tak že zabránili expresi genu pro cGAS (cGAS knockout) a zajistili expresi cGAS deletovaného na N konci (cGAS $\Delta$ N). Zkrácený cGAS na rozdíl od neupraveného (wt) cGAS nebyl asociovaný s membránou a nacházel se v cytosolu a v jádře. Oba, neupravený wt cGAS i cGAS $\Delta$ N, vedly k indukci IFNs typu I, avšak cGAS $\Delta$ N vykazoval produkci větší než wt cGAS. Oproti tomu, verze cGAS neschopná vázat DNA (cGAS $\Delta$ N [C396/397A]) interferony neindukovala. Po vyvolání genotoxického stresu peroxidem vodíku došlo u monocytů THP1 exprimujících WT nebo cGAS $\Delta$ N k spuštění interferonové odpovědi, avšak míra indukce IFN v buňkách exprimujících cGAS $\Delta$ N byla o mnoho větší. Naopak, při infekci modifikovaným virem Vakcinie (poxvirus s genomem ve formě dsDNA, replikující se v cytoplazmě) byly cGAS $\Delta$ N buňky více náchylné k virové infekci a jejich produkce IFNs prvního typu byla nižší ve srovnání s buňkami produkujícími nezkrácený cGAS. Tyto výsledky vedly autory k závěru, že lokalizace cGAS v buňce determinuje jeho preferenci pro rozpoznání cizí DNA při infekci, nebo vlastní DNA při genotoxickém stresu (Barnett et al., 2019). Role jaderného cGAS souvisí s jeho nekanonickou funkcí a bude vysvětlena níže.

Zahájení aktivity cGAS je spojeno s detekcí dsDNA, se kterou tvoří rozsáhlé elektrostatické interakce, vodíkové můstky a je napojený na její fosfátovou páteř (Li et al., 2013). Rozpoznání dsDNA není závislé na sekvenci, nýbrž na délce detekované DNA. Minimální možná délka pro aktivaci cGAS, udávaná v párech bazí (bp), je 20bp, avšak při této délce DNA je aktivace cGAS nízká (Andreeva et al., 2017). Po navázání dsDNA dochází k dimerizaci cGAS, která stabilizuje enzymatickou konformaci cGAMP syntázy (Li et al., 2013). Formování prvotních dimerů na dsDNA je energeticky nevýhodné, avšak svou přítomností přeskupí dsDNA do vysoce-afinitního tvaru vhodného pro navázání dalších cGAS dimerů, které společně vytváří žebříkovitou strukturu. V buněčném cytosolu se také vyskytují proteiny, které hrají podobnou roli v aktivaci cGAS jako jeho dimerizace. Mitochondriální nukleoidní proteiny HU pocházející z bakterií, mitochondriální transkripční faktor A (TFAM) a „high-mobility group box 1 protein“ (HMGB1) jsou schopné měnit strukturu DNA do tvaru U, či tvořit struktury podobné bakteriálním nukleoidům. Po zvýšení koncentrace těchto proteinů v cytosolu testovaných buněk došlo k 25násobnému zvýšení aktivace cGAS (Andreeva et al., 2017). Jak už bylo zmíněno, dimerizace stabilizuje enzymatickou konformaci cGAS, což vede k následné produkci cGAMP z adenosintrifosfátu (ATP) a guanosintrifosfátu (GTP) (Sun et al., 2013). Tato produkce probíhá v kapénkovitých strukturách, které mohou být považovány za mikroreaktory. Je prokázáno, že po detekci dsDNA cGAS dochází k vytvoření mikrometrových kapének, které se navzájem slučují a tím se i zvětšují. Do takto vzniklých kapének se dále koncentrují cGAS, ATP a GTP, což umocňuje efektivní produkci signální molekuly cGAMP (Du & Chen, 2018).

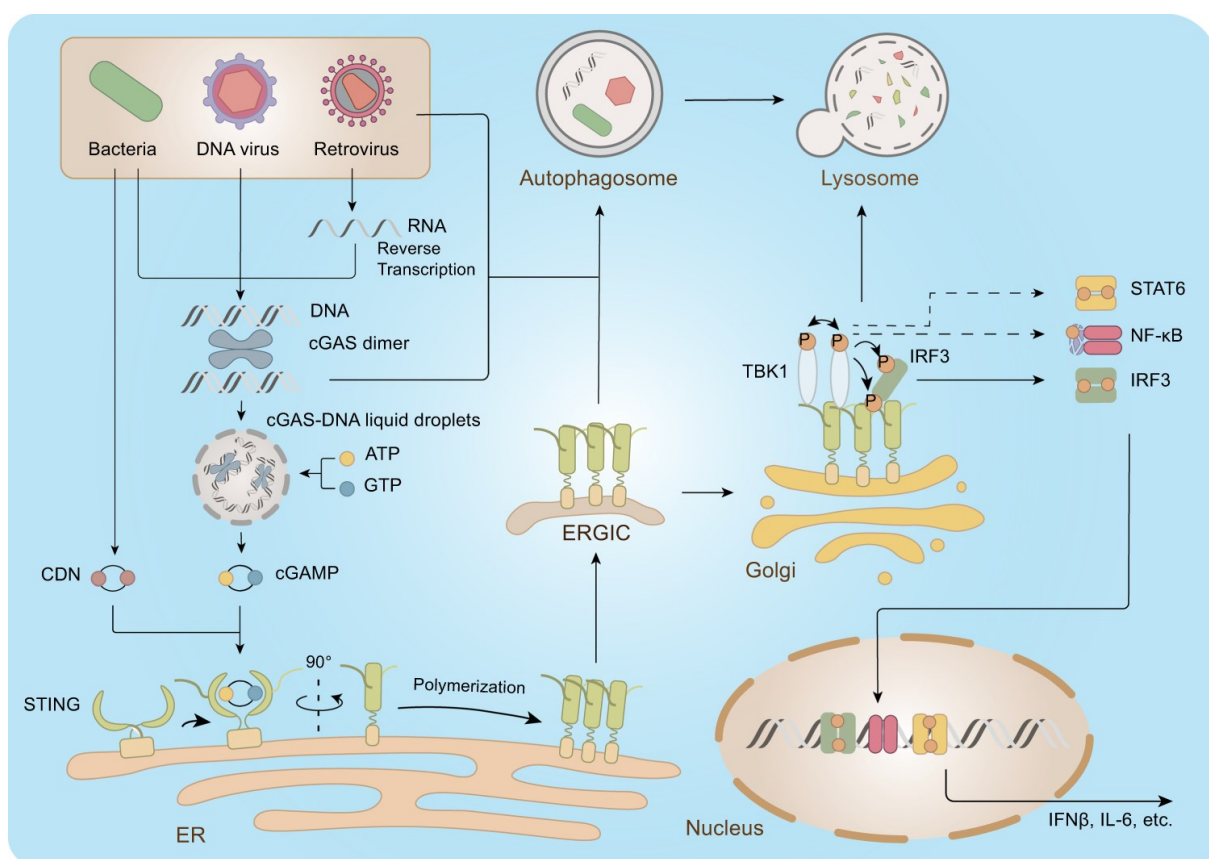
cGAS se uplatňuje hlavně v rozpoznání DNA, zajímavé je, že dvouvláknová RNA je senzorem cGAS také detekována, avšak přestože dochází k tvorbě kapének, navázaná RNA neaktivuje syntézu cGAMP. Vytvoření kapalné fáze tedy ještě nezahrnuje aktivaci cGAS, pokud se na něj neváže správná struktura nukleové kyseliny (tj DNA), která zajišťuje konformační změnu cGAS (Du & Chen, 2018).

Z virů s RNA genomem se cGAS jako senzor uplatňuje v infekcích retroviry. Gao a spolupracovníci ukázali, že DNA vznikající při reverzní transkripci genomové RNA viru HIV (virus lidské imunodeficiency) je detekována cGAS a vede k produkci cGAMP a následné indukci interferonů prvního typu. Podobné výsledky dostali také při infekci virem myši leukémie (MLV) a viru opičí imunodeficiency (SIV) (Gao et al., 2013). Toto tvrzení je podloženo nulovou indukci IFNs typu I v HIV-infikované buněčné linii L929 neobsahující cGAS a také skutečností, že při současné transientní expresi cGAS se indukce IFN při infekci HIV obnovila a v buňkách byl detekován cGAMP (Gao et al., 2013). V dřívější práci bylo ukázáno, že infekce HIV (pseudotypované glykoproteinem z viru vezikulární stomatitidy) vyvolala v myších embryonálních fibroblastech silnou IFN odpověď s deletovanou nukleázou TREX1, která jinak degradaci předchází akumulaci cytoplazmatické DNA, která by spustila mechanismy vrozené imunity (Yan et al., 2010). Gao a spolupracovníci ukázali, že pokud se v těchto TREX1 deficientních buňkách zabrání produkci proteinů cGAS a STING, tak při HIV infekci k indukci IFN

nedojde (Gao et al., 2013). Zatímco dsRNA, přestože je cGAS schopen se na ni vázat jej neaktivuje k produkci cGAMP a tím ani k indukci IFN odpovědi, hybridní dvojitá vlákna tvořená řetězcem DNA a RNA je po navázání cGAS schopné jej k tvorbě cGAMP aktivovat a indukovat IFN odpověď. Množství produkovaného cGAMP je však rozdílné. Dvojitá vlákna DNA vykazují větší míru produkce cGAMP oproti hybridním molekulám i přes jejich shodné tvary malých a velkých žlábků (Mankan et al., 2014).

#### 4.1. cGAS – STING signalizační dráha

Jak je znázorněno na Obr. 9, cGAS-STING signalizační dráha je zahájena rozpoznáním a navázáním dsDNA, senzorem cGAS, což vede k syntéze druhého posla cGAMP enzymatickou aktivitou cGAS (Diner et al., 2013). Tato signalizační molekula je posléze detekována C-koncovou doménou STING (Burdette et al., 2011), což vede k jeho (Diner et al., 2013).



**Obr. 9:** Schématické zobrazení cGAS – STING signalizační dráhy. Přítomnost DNA v cytosolu je známkou infekce patogeny (bakteriemi, DNA viry a retroviry). DNA je rozpoznána cGAS senzorem, což vede k aktivaci a dimerizaci cGAS, tvorbě kapének s koncentrovanými cGAS, DNA, ATP a GTP. Aktivovaný cGAS syntetizuje signální molekulu cGAMP. cGAMP je dále vázán adaptérovým proteinem STING nacházejícím se na endoplazmatickém retikulu. Po navázání cGAMP dochází ke konformačním změnám STING, které vedou k jeho translokaci ke Golgiho aparátu systémem ERGIC. Tam STING iniciuje autofagické procesy, spojené s odstraňováním cytosolické DNA a patogenů. Během translokace STING také rekrutuje kinázu TBK1. Ta je následně trans-autofosforylována a fosforyluje také STING. Fosforylovaný STING rekrutuje IRF3 pro fosforylaci TBK1 kinázou. Fosforylovaný IRF3 dimerizuje a

translokuje do jádra, kde indukuje IFNs Typu I. Zároveň dochází také k aktivaci NF- $\kappa$ B a STAT-6. Translokace STING je zakončena jeho přesunem do lyzozomů, kde dochází k jeho degradaci (Cheng et al., 2020).

Princip aktivace STING spočívá v mnoha na sebe navazujících krocích. Prvním z nich je oligomerizace STING dimerů do lineárních tetramerů, která je uskutečnitelná po navázání cGAMP na ligand-vazebnou doménu (LBD). Navázání ligandu na LBD vede k rotaci LBD o 180°, což umožňuje oligomerizaci, jelikož STING ve svém klidovém stádiu zaujímá konformaci, která mu v tomto brání. Toto tvrzení je doloženo neschopností STING translokovat z endoplazmatického retikula při mutaci LBD (Shang et al., 2019). Simultánně s oligomerizací probíhá i translokace STING z ER do ERGIC. Při navázání cGAMP na STING umístěný na ER dochází k posílení vazeb proteinu STING s proteinem SEC24C, který je součástí proteinového komplexu sloužícímu k vezikulárnímu transportu z ER do váček proteinového komplexu (COP-II) a následně probíhá translokace (Gui et al., 2019). Další aktivační fází je rekrutování TBK1, k čemuž slouží C-koncový TBK1-vazebný motiv (TBM) proteinu STING, konzervovaný napříč organismy. Dimer TBK1 interaguje se dvěma TBMs dimerizovaného STING, avšak dimer TBK1 není aktivní a vyžaduje fosforylaci serinového zbytku. Jedním ze způsobů aktivace TBK1 je její oligomerizace, která vede k přiblížení TBK1 dimerů k sobě a následné trans-autofosforylaci. Jelikož STING také tvoří oligomery, poskytuje tak vhodnou strukturu pro navázání TBK1, která oligomerizuje, fosforyluje sebe a STING. Tyto poznatky jsou podloženy vytvořením mutací v TBM, kdy nedochází k STING-TBK1 interakci, a tudíž neprobíhá ani IRF3 indukovaná produkce IFNs typu I při stimulaci cGAMP. Takto fosforylovaný STING rekrutuje IRF3 a zprostředkuje jeho fosforylaci již navázanou TBK1 (Zhang et al., 2019). Dřívější studie prokázala, že C konec IRF3 slouží k interakci s fosforylovaným STING a zároveň k interakci s již fosforylovaným IRF3. Jakmile proběhne fosforylace na STING navázaného IRF3, dochází k rekrutování nefosforylovaného IRF3 a tvoří se společný dimer, jenž se oddělí od STING a translokuje do jádra, kde indukuje produkci interferonů prvního typu (Liu et al., 2015). STING také aktivuje NF- $\kappa$ B, a to před translokací do ERGIC systému, tudíž je tato aktivace nezávislá na TBK1 a IRF3, avšak detaily aktivace nejsou známy (Stempel et al., 2019).

Dlouhodobá přítomnost aktivovaného STING komplexu vyvolává nepřiměřeně silnou imunitní odpověď ve formě kontinuální produkce, či nadprodukce IFNs, což vede k chronickým onemocněním. Aby nedošlo k těmto nechtěným efektům, je nutná degradace STING v lyzozomech, do kterých jsou směrovány autofagozomy a endozomy. Tento mechanismus je zajištěn autofágií indukovanou proteinem STING, ke které dochází při infekci DNA viry, či stimulaci DNA. Molekuly RNA takové indukční účinky nemají (Gui et al., 2019).

Aktivace autofágie je vedle indukce tvorby interferonů a prozánětlivých cytokinů důležitou funkcí signalizační dráhy cGAS – STING. Jak již bylo zmíněno, STING aktivovaný cGAMP je translokován z endoplazmatického retikula ERGIC systémem. Ten poskytuje membrány pro lipidaci LC3 (Gui et al., 2019). Lipidace je druh post-translační modifikace, při které dochází ke kovalentnímu připojení lipidické

složky LC3 a napojení k membráně (Chen et al., 2018). Lipidace LC3 vede k vytvoření autofagozomů. Lipidace LC3 indukovaná cGAMP je nezávislá na TBK1 a na signalizační C-koncové doméně proteinu STING. Aktivace autofágie signalizační dráhou cGAS – STING je tak nezávislá na schopnosti této dráhy indukovat IFN odpověď. Autofagozomy pak dovedou cytosolickou endogenní nebo virovou DNA (a také aktivovaný STING) k degradaci v lyzozomech (Gui et al., 2019). cGAS-STING signalizační dráha mořského korálnatce, sasanka *Nematostella vectensis*, která se od lidské evoluce oddělila před 500 miliony lety, produkuje cGAMP, avšak homolog proteinu STING – *NvSTING* nemá C-koncovou doménu, a tudíž nevede k aktivaci kinázy TBK1, ani k produkci IFN typu I (Kranzusch et al., 2015). Avšak *NvSTING* má schopnost stimulovat po aktivaci cGAMP LC3 lipidaci a navodit autofágii. Podobně je tomu také u *Xenopus tropicalis*. Tyto výsledky naznačují, že indukce autofágie je evolučně mnohem starší a zakonzervovaná funkce cGAS-STING než indukce interferonu, která se vyvinula později u obratlovců (Gui et al., 2019).

#### **4.2. Role cGAS v detekci endogenní DNA**

DNA je lokalizovaná v jádře buňky a její retence je přísně hlídána, čímž se předchází nechtěné detekci endogenní DNA v klidovém stádiu buňky. Pokud je jaderná retence narušena, DNA se hromadí v cytoplazmě, ve které je detekovaná cGAS a dochází k chronickým zánětlivým onemocněním (Gao et al., 2015).

Jednou z forem úniku jaderné DNA do cytosolu jsou mikrojádra, jejichž vznik je výsledkem genotoxického stresu, exogenního poškození DNA, či nedokonalé segregace DNA do dceřiných buněk při buněčném dělení (MacKenzie et al., 2017). Mikrojaderná DNA je velmi náchylná k poškození z důvodu mnoha strukturních defektů v lamině, což vede k rozpadu mikrojaderné membrány u více než poloviny mikrojader přítomných v interfázi (Hatch et al., 2013). Kolaps mikrojaderné membrány vystavuje chromatin cytosolickým proteinům, mezi něž patří cGAS, který se na chromatin rychle váže a následně zahajuje produkci cGAMP, což dále vede k aktivaci již zmíněné cGAS-STING signalizační dráhy (MacKenzie et al., 2017).

S mikrojádry se pojí i nově objevená role cGAS v jejich degradaci autofagickým procesem nazývaným mikronukleofágie, který je funkčně oddělený od kanonické cGAS-STING signalizace, nezávislý na katalytické funkci cGAS (Zhao et al., 2021). Bylo pozorováno, že mikrojádra jsou odklízena z cytosolu autofágií (Rello-Varona et al., 2012), ale o receptoru odpovědném za mikronukleofági se nic nevědělo. Studie Zhao a spolupracovníků z letošního roku ukázala, že zprostředkovatelem tohoto procesu je cGAS. Protein cGAS totiž obsahuje několik vazebných sekvenčních oblastí (LIRs), které jsou důležité pro interakci s autofagickým proteinem LC3B na membránách tvořících autofagozom. Tyto LIRs jsou přítomny na různých receptorech autofágie, které zároveň vážou LC3B a náklad určený pro autofágii. Komplex cGAS-LC3B se lokalizuje k mikrojádřům a navádí mikrojádra do autofagozomů a

následně do lyzozomů pro degradaci. LC3-vazebné oblasti LIRs na proteinu cGAS jsou nezbytné pro proteinem cGAS zprostředkovanou mikronukleofágií. Jejich delece zcela inhibuje interakci s LC3, a tím i mikronukleofágií. Tento fakt naznačuje, že cGAS plní roli receptoru pro mikronukleofágií (Zhao et al., 2021). Zároveň, jak už bylo uvedeno výše, působí jako senzor DNA uvolňované v cytoplazmě z mikrojader, který syntézou cGAMP spouští signální dráhu vedoucí k indukci IFN imunitní odpovědi (MacKenzie et al., 2017). Nabízí se tedy otázka, která z těchto funkcí má přednost před druhou a zdali se vzájemně ovlivňují. I na tuto otázku se práce (Zhao et al., 2021) snažila odpovědět. Pro zjištění odpovědi byla měřena produkce cGAMP v lidských osteosarkomových buňkách (U2OS), které byly stimulovány nokodazolem k tvorbě mikrojader, což vedlo k zvýšení produkce cGAMP. Při inhibici formování lyzozymů, kdy množství mikrojader nemohlo být regulováno mikronukleofágií se produkce cGAMP dále zvýšila. Avšak jinak tomu bylo v buněčné linii U2OS deficientní na cGAS. Po zajištění exprese cGAS mutovaného v LIR, neschopného zprostředkovat mikronukleofágií, ale obsahujícího katalytickou doménu pro syntézu cGAMP. V těchto buňkách při inhibici formování lyzozomů (a tedy zvýšeném množství mikrojader v cytosolu) k zesílení produkce cGAMP nedošlo. To vedlo autory k závěru, že nekanonická mikronukleofágie zprostředkovaná cGAS-LC3B kontroluje negativní regulaci kanonickou funkcí cGAS vedoucí k produkci interferonu (Zhao et al., 2021).

#### 4.2.1. Funkce cGAS v jádře

Buněčné jádro je chráněno jadernou membránou, která je při mitóze rozložena a poté znovu složena, aby došlo ke správné segregaci DNA do dceřiných buněk (Güttinger et al., 2009). Právě při narušení jaderné membrány může docházet k translokaci cytosolických faktorů do jádra, mezi něž patří i cGAS. V myších embryonálních fibroblastech bylo pozorováno, že cGAS translokuje do jádra během mitózy, nebo buněčného dělení (Yang et al., 2017). Další práce tvrdí, že cGAS, ačkoliv funguje jako cytosolický senzor, je primárně proteinem jaderným. Volkman se spolupracovníky popsali, že cGAS je predominantně proteinem jaderným, a to bez ohledu na fázi na fázi buněčného cyklu. V jádře je úzce vázán s chromatinem. Autoři článku předpokládají, že pevná vazba na chromatin by v jádře mohla umožnit rozpoznání vlastní DNA od cizí, například od herpesvirových genomů (Volkman et al., 2019). Gentili a spol. uvádí, že jaderný cGAS má zachovanou svoji enzymatickou aktivitu a je schopen produkovat cGAMP a dále navázat na cGAS-STING signalizační dráhu, avšak jeho aktivace je 200x slabší oproti cytosolickému cGAS. Jaderná lokalizace cGAS je rozprostřená kolem celého genomu, avšak největší míra koncentrace je na centromerách chromozomů, na které se váže svou N-koncovou doménou. Toto tvrzení je podpořeno fluorescenční mikroskopií, kdy fluorescenčně upravený cGAS s jaderným lokalizačním signálem (GFP-NLS-cGAS) tvoří ohniska kolem centromer. Při mutaci N konce nedochází k navázání na centromery, tudíž se netvoří pozorovatelná ohniska ani nedochází k aktivaci cGAS (Gentili et al., 2019). Ovšem jiné práce uvádějí, že cGAS v jádře úlohu senzoru dsDNA nevykonává a cGAMP neprodukuje. Například studie autorů Sun a kolektiv uvádí, že protein cGAS má jaderný

exportní signál NES (<sup>169</sup>LEKLK<sup>174</sup>), který je nutný pro jeho translokaci z jádra do cytosolu, aby mohl vykonávat roli cytoplazmatického senzoru DNA (Sun et al., 2021). Protein cGAS mutovaný v tomto místě zůstává shromážděný v jádře a nedochází k indukci IFN odpovědi na přítomnost DNA v cytosolu. Studie Liu a spolupracovníků si všímá post-translační modifikace cGAS a poukazuje na roli B-lymfoidní tyrosin kinázy (BLK) ve fosforylaci cGAS. Fosforylovaný cGAS se vyskytuje v cytosolu, avšak při buněčném stresu dochází k defosforylaci a následné translokaci do jádra. Karyoferiny (KFNA) 1-5 jsou proteiny spadající do skupiny importinů- $\alpha$ , které interagují s dvěma jadernými lokalizačními signály cGAS (NLS1/2), z nichž NLS2 je pro jadernou translokaci klíčový (Liu et al., 2018).

Bylo zjištěno, že cGAS má v jádře funkci nesouvisející s jeho vlastnostmi senzoru, ale zasahuje do opravných mechanismů endogenní DNA, kde působí jako inhibitor homologní rekombinace (Liu et al., 2018). Zlomy dsDNA (DSB), vedou při nesprávném opravení k řadě nežádoucích efektů jako například delece chromozomů, translokace vedoucí k nestabilitě genů a s tím odvozené tumorogenezi i zrychlenému stárnutí buněk (Jackson & Bartek, 2009). Buněčný systém reparace DNA zahrnuje dva hlavní typy procesů: nehomologní spojování konců (NHEJ), které je aktivní po dobu celého buněčného cyklu, avšak náchylné k chybám ve formě delečních a inserčních mutací, vznikajících při ligaci a homologní rekombinace (HR), probíhající v proliferujících se buňkách, tedy ve fázích S a G2. HR je velmi účinná a přesná, jelikož dokáže opravit původní DNA přes interakci s neporušenou sesterskou chromatidou (Chapman et al., 2012). Do míst, ve kterých probíhá DSB, se rekrutuje cGAS a pomocí své C-koncové domény interaguje s fosforylovaným histonem  $\gamma$ H2AX (Liu et al., 2018), označujícím polohu DSB (Rogakou et al., 1998). Pokud  $\gamma$ H2AX fosforylovaný není, nedochází k navázání s cGAS. Při zvýšené expresi cGAS dochází k inhibici homologní rekombinace, avšak NHEJ není nijak ovlivněno a produkce IFNs typu I se také nezvyšuje, což naznačuje, že indukce interferonů prvního typu je nezávislá na inhibici homologní rekombinace. Při zrušení exprese cGAS byla HR obnovena. Mechanismus inhibice reparace DNA pomocí HR spočívá v interakci cGAS s poly ADP-ribóza polymerázou 1 (PARP1) skrze poly ADP-ribózu (PAR) (Liu et al., 2018). PARP1 a PAR se podílí na homologní rekombinaci (Hu et al., 2014) společně s proteinem Timeless (Xie et al., 2015). Při nadměrné expresi cGAS dochází k masivní inhibici homologní rekombinace, avšak zastavení enzymatické aktivity PARP1 vede k úplné inhibici a cGAS se do jádra netranslokuje. Tento jev naznačuje že poškození DNA a následná aktivace PARP1 je prerekvizitou pro translokaci do jádra. Absence jaderného cGAS v myších plicních rakovinových buňkách (LLC) vyústí v pomalejší rakovinové bujení, což poukazuje na pozitivní efekt jaderného cGAS na tumorogenezi inhibicí DNA reparace homologní rekombinací. Jako důkaz tohoto tvrzení slouží i velikost nádorů. Rakovinové buňky neobsahující cGAS mají oproti rakovinovým buňkám s cGAS velikost i hmotnost menší (Liu et al., 2018).

## 5. IFI16

Interferonem  $\gamma$  indukovatelný protein 16 (IFI16) a jeho myší ortolog p204 byly objeveny při pátrání po nových DNA senzorech jako protein přímo se vážící na interferon indukující DNA motivy z genomu viru Vakcinie a herpesvirů. Jejich výskyt byl pozorován jak v jádře, tak cytosolu (Unterholzner et al., 2010). Funkce IFI16 se liší v závislosti na jeho jaderné, či cytoplazmatické lokalizaci, ale i na buněčném typu, ve kterém se vyskytuje. V jádře inhibuje expresi virové DNA (Orzalli et al., 2013) a tvoří inflamazomový komplex, který dále translokuje do cytoplazmy, kde dochází k produkci IL-1 $\beta$  (Guo et al., 2015). V cytoplasmě se také podílí na stimulaci cGAS-STING signální dráhy (Dutta et al., 2015), a zároveň hraje roli v nekanonické aktivaci STING vyvolané poškozením DNA, která vede k indukci NF- $\kappa$ B a produkci IFNs a IL-6 (Dunphy et al., 2018).

IFI16 spadá do proteinové skupiny PYHIN, pojmenované podle domén PYD a HIN, které jsou pro tuto skupinu charakteristické. Do PYHIN skupiny také náleží již zmíněný DNA senzor AIM2 a společně s IFI16 tvoří AIM2-podobné receptory (ALRs). Dvě C-koncové HIN domény slouží k detekci dsDNA (Unterholzner et al., 2010), N-koncová PYD doména zprostředkovává proteinové interakce, které posilují detekční schopnosti IFI16 a budou zmíněny níže (Lum et al., 2019). Podobně jako je tomu u cGAS, rozpoznání dsDNA není závislé na sekvenci, avšak na délce, kdy minimální délka 60 bp vykazuje nejvyšší míru detekce. Myším ortolog IFI16 je p204, který má dvě HIN domény a jednu PYD doménu, avšak složením aminokyselin se lidskému IFI16 podobá jen ze 37 %. V myších buňkách vykonává podobné funkce jako IFI16 v buňkách lidských, a to především v translokaci IRF3 a NF- $\kappa$ B podjednotky p65 do jádra jako imunitní odpověď na infekci virů s dsDNA genomu (Unterholzner et al., 2010).

### 5.1. Funkce IFI16 v jádře infikovaných buněk

Funkce IFI16 byla studována téměř výhradně při infekcích různými herpesviry. Jsou to relativně velké obalené viry, jejichž genomy tvořené lineární dsDNA dosahují velikosti v rozmezí 125 až 240 bp a replikují se v buněčném jádře. Z osmi známých lidských herpesvirů byly pro studium jejich rozpoznání imunitním systémem používány hlavně: herpes simplex virus 1 (HSV-1) (Johnson et al., 2014), virus Kaposiho sarkomu (KSHV) (Roy et al., 2016) a virus Epstein-Barrové (EBV) (Pisano et al., 2017). Hostitelská buňka se brání virové infekci DNA viry rozpoznáváním jejich genomů v jádře detekcí senzorem IFI16, který tvoří jaderné proteinové komplexy s rozlišnými funkcemi (Dutta et al., 2015). Tyto komplexy translokují do cytoplazmy, kde se zapojují do cGAS-STING signální dráhy (Iqbal et al., 2016).

Komplexy jaderných proteinů s IFI16 se v buňkách vyskytují i v klidovém stavu a při infekci se jejich množství zvyšuje. Jedním z těchto komplexů je spojení IFI16 s multifunkčním nádorovým supresorem BRCA1 a již v této práci zmíněným apoptotickým proteinem ASC. Vzájemná interakce BRCA1 a IFI16 je klíčová v detekci DNA, jelikož při nulové expresi BRCA1 v lidských mikrovaskulárních



endoteliálních buňkách (HMVEC) infikovaných KSHV, EBV nebo HSV-1 nedochází k translokaci IFI16 do cytoplazmy, a tím ani k imunitní odpovědi vyvolané STING, ani k produkci IL-1 $\beta$ . Interakce BRCA1 s ASC je nezbytná, jelikož ASC rekrutuje pro-kaspázu 1. Komplex je součástí inflamazomu, který během herpesvirové infekce translokuje do cytosolu, kde probíhá jeho aktivace přes kaspázu-1. Tento poznatek je doložen nepřítomností komplexu BRCA1-IFI16-ASC v cytosolu v klidovém stádiu buňky a dále zvýšenou mírou vazby komplexu s kaspázou-1 při infekci, což indikuje úspěšnou aktivaci inflamazomu (Dutta et al., 2015).

Druhý jaderný komplex zahrnuje BRCA1, IFI16, histon H2B a je funkčně nezávislý na prvně zmíněném komplexu, jelikož neinteraguje s ASC, a tudíž nezasahuje do formace inflamazomu. Jeho funkce spočívá ve schopnosti IFI16 detekovat virovou DNA. Zabránění expresi H2B v HMVEC zcela inhibovalo navázání IFI16 na DNA ligand. Po rozpoznání virové DNA za pomoci H2B, BRCA1 a IFI16 dochází k acetylaci tohoto komplexu histon acetyl transferázou p300. Acetylace je klíčový proces umožňující translokaci do cytoplazmy pomocí Ran GTPázy. Po translokaci do cytoplazmy se tento komplex podílí na stimulaci STING, což dále vede k indukci IFNs typu I a bude vysvětleno dále v této práci. Tato skutečnost je podložena inhibičním experimentem, ve kterém působení C646 inhibitoru histon acetyl-transferázy p300 zabraňující acetylaci má za následek zmaření translokace komplexu (zprostředkované Ran GTPázou) do cytoplazmy a podílení se v STING signalizační dráze (Iqbal et al., 2016).

Přibývá stále více informací o tom, že IFI16 má kromě aktivace signálních drah vedoucích k indukci IFN a jiných cytokinů i funkce restričních faktorů, které mohou přímo negativně ovlivňovat virovou produkci v buňce. Lum a spolupracovníci ukázali, že IFI16 přímo potlačuje v jádře expresi herpesvirových genů.

Jeden mechanismus spočívá v oligomerizaci PYD domén IFI16. K oligomerizaci dochází na jaderné periférii, kde IFI16 váže virovou DNA svými HIN doménami. Autoři práce (Lum et al., 2019) ukázali, že oligomerizace IFI16 PYD doménami na herpesvirové DNA podporuje interakce proteinu IFI16 s proteiny, které mají funkce v transkripční regulaci. S oligomerizovanými PYD interaguje například transkripční faktor UBTF a s polymerázou II spojený transkripční faktor 1 (PAF1). Tyto buněčné faktory pak potlačují herpesvirovou časnou transkripci. Autoři postulují, že oligomerizace IFI16 zprostředkovaná PYD doménami slouží jednak jako platforma pro amplifikaci signálu k aktivaci odpovědi vrozené imunity, jednak pro rekrutování buněčných transkripčních faktorů k potlačení herpesvirové replikace (Lum et al., 2019).

Jiný mechanismus restrikce herpesvirové infekce proteinem IFI16 je popsán v práci (Orzalli et al., 2013). Autoři pracovali s mutantním HSV-1 (ICP0-null), který neprodukoval časný protein ICP0, který je namířen proti mechanismům vrozené imunity a zjistili, že IFI16 podporuje přidávání

metylačních značek chromatinu – trimethylaci histonu H3 na lysinu 9 (H3K9me3) a ubírání značek euchromatinu – trimethylaci histonu H3 na lysinu 4 (H3K4me3). Jak je známo, euchromatin je spojený s aktivním přepisem genů a naopak, heterochromatin přepisu zabraňuje. Společně tyto metylace zabraňují expresi HSV-1 genů, která v buňkách bez IFI16 probíhá bez omezení. Protein IFI16 je tak zapojen do epigenetické regulace exprese herpesvirových genů (Orzalli et al., 2013).

## **5.2. Význam cytosolické lokalizace IFI16**

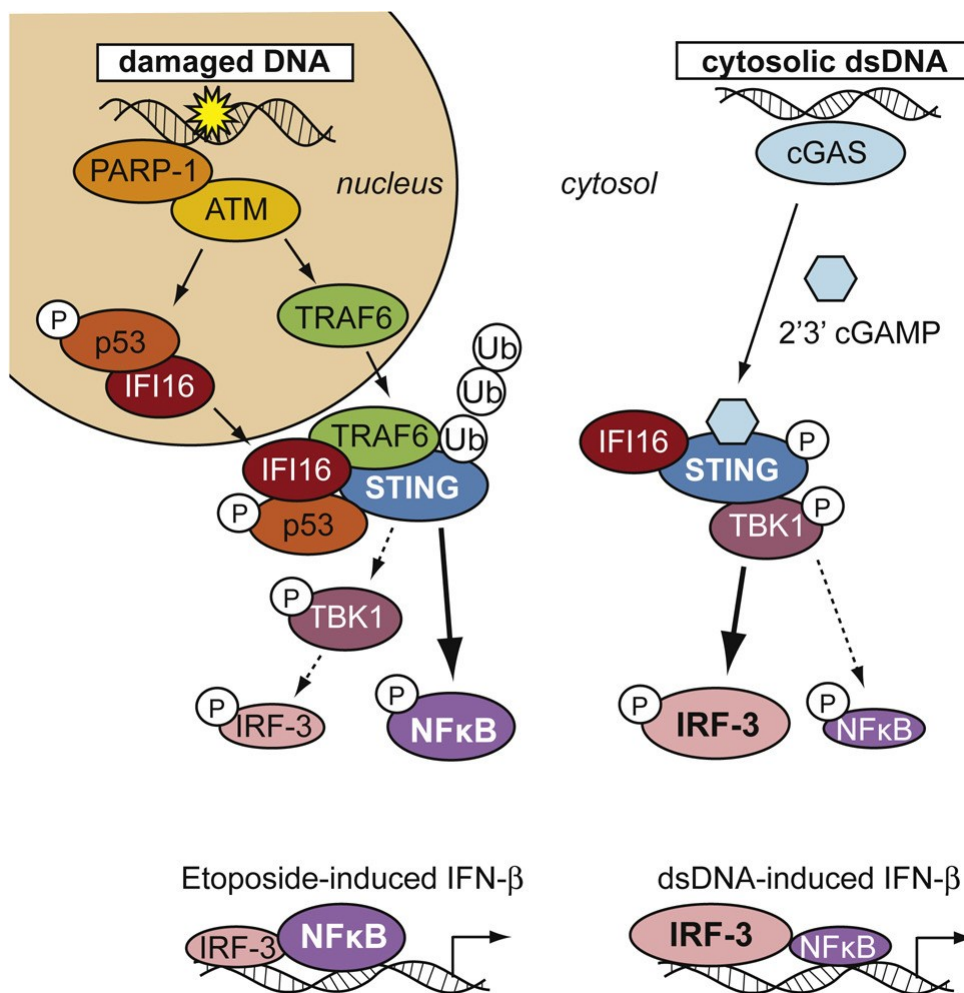
DNA senzor IFI16, ačkoliv detekuje virové genomy v jádře, má významnou roli po translokaci do cytosolu. Tam má nezastupitelnou úlohu ve vytvoření komplexu s adaptérem STING (Iqbal et al., 2016). Podílí se na jeho aktivaci tím, že zřejmě rekrutuje k proteinu STING další složky komplexu, potřebné pro následné kroky indukce interferonu, například kinázu TBK1 v kanonické signální dráze po aktivaci cGAS, nebo jak bude popsáno v následující kapitole, složky komplexu STING v nekanonické dráze. Přesný mechanismus, jakým je IFI16 k proteinu STING rekrutován není doposud jasný.

Ve studii (Jønsson et al., 2017) autoři vyvozují na základě významného poklesu cGAMP v monocyttech neexprimujících gen pro IFI16, že IFI16 kooperuje s cGAS pro optimální produkci cGAMP. Postulují, že IFI16 funguje jako kofaktor pro cGAS. Přímá interakce cGAS a IFI16 však nebyla pozorována. Interakce obou proteinů by mohla být zprostředkována DNA (Almine et al., 2017). Naopak, produkce nebo absence IFI16 neměla vliv na produkci cGAMP v lidských keratinocytech (Almine et al., 2017). Nicméně, na důležitosti IFI16 pro vytvoření komplexu s aktivovaným STING se shodují všechny práce bez ohledu na typ buněk, ve kterých byly studie prováděny.

### **5.2.1. Role IFI16 v nekanonické aktivaci STING**

Mezi role, které IFI16 v buňce plní, patří i účast v nekanonické aktivaci STING, jež je vyvolaná poškozením endogenní DNA. Autoři Dunphy a spolupracovníci pozorovali v lidských keratinocytech vystaveným účinkům etoposidu, který vyvolává zlomy dsDNA, indukci produkce IFN  $\beta$ , interleukinu 6 a chemokinu CCL20 závislou na aktivaci NF- $\kappa$ B. Tato nekanonická indukce je závislá na proteinech IFI16 a STING, avšak nikoliv na aktivaci senzoru cGAS a produkci cGAMP. Toto tvrzení je podloženo několika fakty. V lidských monocyttech THP1 bez cGAS dochází k translokaci p65 podjednotky do jádra i k tvorbě interferonů prvního typu, avšak monocyty neobsahující IFI16 tuto schopnost postrádají. Aktivace adaptéru STING je zprostředkována proteinem IFI16 a proteiny spojenými s odpověďmi na poškození DNA (DDR), kinázou ATM (ataxia telangiectasia mutated) a polymerázou PARP1 (Dunphy et al., 2018). ATM kináza fosforyluje p53, který interaguje s IFI16 přímo (Liao et al., 2011). Oba tyto proteiny jsou pak součástí komplexu se STING, přičemž pro připojení fosforylovaného p53 k STING komplexu je vyžadována interakce p53 s IFI16. Součástí komplexu STING je také TRAF6, pro jehož cílení na STING je také požadován IFI16. TRAF6 je velmi důležitý pro aktivaci proteinu STING, protože zprostředkovává ubiquitylaci na lysinu K63. Na Obr. 10 je vlevo schéma zde popsané nekanonické dráhy vyvolané

poškozením DNA a vpravo pro srovnání kanonické signální dráhy aktivované senzorem cGAS a jeho produktem cGAMP. Zatímco STING aktivovaný dinukleotidy cGAMP je v komplexu s TBK1 fosforylován a indukce IFN vede především přes aktivaci IRF3, u nekanonické dráhy je STING ubiquitinylován a následná aktivace NF- $\kappa$ B vede k indukci alternativního programu genové exprese. IFI16 je součástí STING komplexu v obou drahách (Dunphy et al., 2018).



**Obr. 10:** Schéma modelu nekanonické aktivace STING pomocí IFI16 (vlevo) a kanonické dráhy vycházející z rozpoznání DNA senzorem cGAS pro srovnání (vpravo). Poškození jaderné DNA je detekováno PARP-1 a ATM. Dochází k fosforylaci onkosupresoru p53 pomocí ATM, který se váže na IFI16 a je translokován do cytosolu. Současně dochází k cytosolické translokaci TRAF6, který společně s IFI16-p53 komplexem interaguje se STING. TRAF6 poté zajišťuje ubiquitinylnaci STING a probíhá aktivace NF- $\kappa$ B, která vede k indukci interferonů typu I a dalších cytokinů (Dunphy et al., 2018).

## 6. Závěr

Během poslední dekády došlo k extenzivnímu výzkumu detekčních molekul jak pro virovou RNA, tak pro DNA. Tyto výzkumy odhalily mnoho typů senzorů nukleových kyselin a z velké části objasnily principy jejich signálních drah. I přes poznatky, které byly získány, jsou stále mezery

v podrobné charakterizaci – signalizačních drahách, které nebyly zcela vysvětleny, jako je tomu například v ovlivnění aktivace STING RNA senzorem RIG-1.

Tato práce se věnuje charakterizaci DNA senzorů cGAS a IFI16 v kontextu aktivace signálních drah, které vedou k indukci interferonů a interleukinů. Prvotní studie popsaly cGAS jako cytosolický senzor DNA produkující druhého posla cGAMP a IFI16 jako senzor jaderný, který je translokován do cytoplazmy. Tato zjištění sice stále platí, avšak novější studie vnášejí do této problematiky více nových skutečností a překvapivých informací o komplexní funkci cGAS. cGAS se nevyskytuje pouze v cytosolu, volně, či vázán na cytoplazmatické membráně, kde je aktivován po vazbě na DNA k tvorbě cGAMP a kde má podle nedávno publikované práce (Zhao et al., 2021) také roli redukce počtu mikrojader autofagickým mechanismem. Vyskytuje se i v buněčném jádře, kde inhibuje opravy DNA homologní rekombinací. Nejenom že jsou tyto funkce nezávislé na kanonických rolích cGAS, ale dokonce nekanonická mikronukleofágie tlumí produkci cGAMP, což poukazuje na důležitost nekanonických funkcí. Podobně je tomu i v případě IFI16, jehož déle známá role v inhibici virové replikace v jádře byla později objasněna oligomerizací, tvořením proteinových komplexů a jejich translokací do cytosolu, ve kterém stimuluje STING, nebo ho aktivuje nekanonickým způsobem spojeným s poškozením DNA v jádře.

Jelikož rozmanitost funkcí jednotlivých DNA senzorů byla prokázána, je dle mého názoru pravděpodobné, že by mohly existovat další nekanonické vlastnosti u již objevených senzorů, které by vysvětlovaly již zmíněné mezery v signalizačních drahách. Jedním možným kandidátem, by mohl být IFI16, u něhož byla identifikována interakce s více proteiny. Důležitým předmětem budoucího studia je například v této práci neřešená role post-translačních modifikací v regulaci jednotlivých účastníků signálních drah vedoucích k indukci odpovědi vrozené imunity. Dalším důležitým směrem studia jsou také mechanismy, jakými virové produkty zasahují do mechanismů obrany vrozené imunity. Pochopení těchto složitých interakcí je předpokladem k účinnému boji proti virovým infekcím.

## 7. Seznam použité literatury

Použití symbolu \* za citací se rozumí, že daná citace je sekundární.

- Abdelhaleem, M., Maltais, L., & Wain, H. (2003). The human DDX and DHX gene families of putative RNA helicases. *Genomics*, 81(6), 618–622. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00049-1)
- Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K. A., & Hornung, V. (2009). RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nature Immunology*, 10(10), 1065–1072. <https://doi.org/10.1038/ni.1779>
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., & Medzhitov, R. (2001). *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3*. [www.nature.com](http://www.nature.com)
- Almine, J. F., O'Hare, C. A. J., Dunphy, G., Haga, I. R., Naik, R. J., Atrih, A., Connolly, D. J., Taylor, J., Kelsall, I. R., Bowie, A. G., Beard, P. M., & Unterholzner, L. (2017). IFI16 and cGAS cooperate in

- the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14392>
- Andreeva, L., Hiller, B., Kostrewa, D., Lässig, C., de Oliveira Mann, C. C., Jan Drexler, D., Maiser, A., Gaidt, M., Leonhardt, H., Hornung, V., & Hopfner, K. P. (2017). CGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders. *Nature*, 549(7672), 394–398. <https://doi.org/10.1038/nature23890>
- Barnett, K. C., Coronas-Serna, J. M., Zhou, W., Ernandes, M. J., Cao, A., Kranzusch, P. J., & Kagan, J. C. (2019). Phosphoinositide Interactions Position cGAS at the Plasma Membrane to Ensure Efficient Distinction between Self- and Viral DNA. *Cell*, 176(6), 1432-1446.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.049>
- Briard, B., Place, D. E., & Kanneganti, T. D. (2020). DNA sensing in the innate immune response. In *Physiology* (Vol. 35, Issue 2, pp. 112–124). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2019>
- Bruey, J. M., Bruey-Sedano, N., Luciano, F., Zhai, D., Balpai, R., Xu, C., Kress, C. L., Bailly-Maitre, B., Li, X., Osterman, A., Matsuzawa, S. ichi, Terskikh, A. v., Faustin, B., & Reed, J. C. (2007). Bcl-2 and Bcl-XL Regulate Proinflammatory Caspase-1 Activation by Interaction with NALP1. *Cell*, 129(1), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.045>
- Bryan, N. B., Dorfleutner, A., Kramer, S. J., Yun, C., Rojanasakul, Y., & Stehlik, C. (2010). Open Access RESEARCH Differential splicing of the apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) regulates inflammasomes. In *Journal of Inflammation* (Vol. 7). <http://www.journal-inflammation.com/content/7/1/23>
- Burdette, D. L., Monroe, K. M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J. S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y., & Vance, R. E. (2011). STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*, 478(7370), 515–518. <https://doi.org/10.1038/nature10429>
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., & Boulton, S. J. (2012). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. In *Molecular Cell* (Vol. 47, Issue 4, pp. 497–510). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>
- Chattopadhyay, S., Marques, J. T., Yamashita, M., Peters, K. L., Smith, K., Desai, A., Williams, B. R. G., & Sen, G. C. (2010). Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *EMBO Journal*, 29(10), 1762–1773. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.50>
- Chen, & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 12, pp. 826–837). <https://doi.org/10.1038/nri2873>
- Chen, Sun, Y., Niu, J., Jarugumilli, G. K., & Wu, X. (2018). Protein Lipidation in Cell Signaling and Diseases: Function, Regulation, and Therapeutic Opportunities. In *Cell Chemical Biology* (Vol. 25, Issue 7, pp. 817–831). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.05.003>
- Cheng, Z., Dai, T., He, X., Zhang, Z., Xie, F., Wang, S., Zhang, L., & Zhou, F. (2020). The interactions between cGAS-STING pathway and pathogens. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 5, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0198-7>
- Christensen, M. H., Jensen, S. B., Miettinen, J. J., Luecke, S., Prabakaran, T., Reinert, L. S., Mettenleiter, T., Chen, Z. J., Knipe, D. M., Sandri-Goldin, R. M., Enquist, L. W., Hartmann, R., Mogensen, T. H., Rice, S. A., Nyman, T. A., Matikainen, S., & Paludan, S. R. (2016). HSV -1 ICP 27 targets the TBK 1-activated STING signalsome to inhibit virus-induced type I IFN expression. *The EMBO Journal*, 35(13), 1385–1399. <https://doi.org/10.15252/embj.201593458>
- Dinarello. (1998). *Interleukin-16, Interleukin-18, and the Interleukin-16 Converting enzyme α*.

- Diner, E. J., Burdette, D. L., Wilson, S. C., Monroe, K. M., Kellenberger, C. A., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Hammond, M. C., & Vance, R. E. (2013). The Innate Immune DNA Sensor cGAS Produces a Noncanonical Cyclic Dinucleotide that Activates Human STING. *Cell Reports*, 3(5), 1355–1361. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.009>
- Diner, Li, Greco, T. M., Crow, M. S., Fuesler, J. A., Wang, J., & Cristea, I. M. (2015). The functional interactome of PYHIN immune regulators reveals IFIX is a sensor of viral DNA. *Molecular Systems Biology*, 11(2), 787. <https://doi.org/10.15252/msb.20145808>
- Du, M., & Chen, Z. J. (2018). DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling. <http://science.sciencemag.org/>
- Dunphy, G., Flannery, S. M., Almine, J. F., Connolly, D. J., Paulus, C., Jønsson, K. L., Jakobsen, M. R., Nevels, M. M., Bowie, A. G., & Unterholzner, L. (2018). Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF- $\kappa$ B Signaling after Nuclear DNA Damage. *Molecular Cell*, 71(5), 745-760.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.034>
- Dutta, D., Dutta, S., Veetil, M. V., Roy, A., Ansari, M. A., Iqbal, J., Chikoti, L., Kumar, B., Johnson, K. E., & Chandran, B. (2015). BRCA1 Regulates IFI16 Mediated Nuclear Innate Sensing of Herpes Viral DNA and Subsequent Induction of the Innate Inflammasome and Interferon- $\beta$  Responses. *PLoS Pathogens*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005030>
- Eisenberg, Evans, Arend, & Verderber. (1990). *Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist.*
- Ferguson, B. J., Mansur, D. S., Peters, N. E., Ren, H., & Smith, G. L. (2012). DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. 1, 47. <https://doi.org/10.7554/eLife.00047>
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M., & Maniatis, T. (2003). IKKE and TBK1 are essential components of the IRF3 signalling pathway. *Nature Immunology*, 4(5), 491–496. <https://doi.org/10.1038/ni921>
- Franchi, L., Kanneganti, T. D., Dubyak, G. R., & Núñez, G. (2007). Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K<sup>+</sup> for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 282(26), 18810–18818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610762200>
- Gack, M. U., Kirchhofer, A., Shin, Y. C., Inn, K.-S., Liang, C., Cui, S., Myong, S., Ha, T., Hopfner, K.-P., & Jung, J. U. (2008). Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804947105](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804947105)
- Gao, D., Li, T., Li, X.-D., Chen, X., Li, Q.-Z., Wight-Carter, M., Chen, Z. J., Casanova, J.-L., Jung, J. U., & P-Y Ting, J. (2015). Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516465112>
- Gao, D., Wu, J., Wu, Y.-T., & Du, F. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune Sensor of HIV and Other Retroviruses. *Science*, 341(6148), 899–903. <https://doi.org/10.1126/science.1241735>
- Gentili, M., Lahaye, X., Nadalin, F., Nader, G. F. P., Puig Lombardi, E., Herve, S., de Silva, N. S., Rookhuizen, D. C., Zueva, E., Goudot, C., Maurin, M., Bochnakian, A., Amigorena, S., Piel, M., Fachinetti, D., Londoño-Vallejo, A., & Manel, N. (2019). The N-Terminal Domain of cGAS Determines Preferential Association with Centromeric DNA and Innate Immune Activation in the Nucleus. *Cell Reports*, 26(9), 2377-2393.e13. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.105>
- Grandvaux, N., Tenoever, B. R., Servant, M. J., & Hiscott, J. (2002). *The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion.* <http://journals.lww.com/co-infectiousdiseases>

- Gray, P., D W Leung, D Pennica, & E Yelverton. (1982). Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature*.
- Gui, X., Yang, H., Li, T., Tan, X., Shi, P., Li, M., Du, F., & Chen, Z. J. (2019). Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature*, *567*(7747), 262–266. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1006-9>
- Guo, H., Callaway, J. B., & Ting, J. P. Y. (2015). Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. In *Nature Medicine* (Vol. 21, Issue 7, pp. 677–687). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>
- Güttinger, S., Laurell, E., & Kutay, U. (2009). *Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis*.
- Haque, S. J., & Williams, B. R. G. (1994). Identification and characterization of an interferon (IFN)-stimulated response element-IFN-stimulated gene factor 3-independent signaling pathway for IFN- $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, *269*(30), 19523–19529. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)32200-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)32200-7)
- Hatch, E. M., Fischer, A. H., Deerinck, T. J., & Hetzer, M. W. (2013). Catastrophic Nuclear Envelope Collapse in Cancer Cell Micronuclei. *Cell*, *154*(1), 47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.007>
- Hayashi, K., Taura, M., & Iwasaki, A. (2018). The interaction between IKK $\alpha$  and LC3 promotes type I interferon production through the TLR9-containing LAPosome. In *Sci. Signal* (Vol. 11). <http://stke.sciencemag.org/>
- Hayashi, Smith, Ozinsky, & Hawn. (2001). *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., & Akira, S. (2004). The Roles of Two I B Kinase-related Kinases in Lipopolysaccharide and Double Stranded RNA Signaling and Viral Infection. *The Journal of Experimental Medicine J. Exp. Med.* *The*, *199*, 1641–1650. <https://doi.org/10.1084/jem.20040520>
- Hemmi, Takeuchi O, Kawai T, & Kaisho T. (2000). *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. [www.nature.com](http://www.nature.com)
- Hida, S., Ogasawara, K., Sato, K., Abe, M., Takayanagi, H., Yokochi, T., Sato, T., Hirose, S., Shirai, T., Taki, S., & Taniguchi, T. (2000). CD8+ T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon- $\alpha/\beta$  signaling. *Immunity*, *13*(5), 643–655. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00064-9)
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D. R., Latz, E., & Fitzgerald, K. A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature07725>
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., Endres, S., & Hartmann, G. (2006). *5  $\eta$ -Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I*. <http://science.sciencemag.org/>
- Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, Q. X., & Chen, Z. J. (2011). MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*, *146*(3), 448–461. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.041>
- Hu, Y., Petit, S. A., Ficarro, S. B., Toomire, K. J., Xie, A., Lim, E., Cao, S. A., Park, E., Eck, M. J., Scully, R., Brown, M., Marto, J. A., & Livingston, D. M. (2014). PARP1-driven poly-ADP-ribosylation regulates BRCA1 function in homologous recombination-mediated DNA repair. *Cancer Discovery*, *4*(12), 1430–1447. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0891>

- Iqbal, J., Ansari, M. A., Kumar, B., Dutta, D., Roy, A., Chikoti, L., Pisano, G., Dutta, S., Vahedi, S., Veettil, M. V., & Chandran, B. (2016). Histone H2B-IFI16 Recognition of Nuclear Herpesviral Genome Induces Cytoplasmic Interferon- $\beta$  Responses. *PLoS Pathogens*, *12*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005967>
- Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O., & Akira, S. (2006). A toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nature Immunology*, *7*(1), 40–48. <https://doi.org/10.1038/ni1282>
- Ishii, K. J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C., & Akira, S. (2008). *TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines*. *451*. <https://doi.org/10.1038/nature06537>
- Ishikawa, H., & Barber, G. N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature07317>
- Ishikawa, H., Ma, Z., & Barber, G. N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08476>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. In *Nature* (Vol. 461, Issue 7267, pp. 1071–1078). <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *54*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>
- Johnson, K. E., Bottero, V., Flaherty, S., Dutta, S., Singh, V. V., & Chandran, B. (2014). IFI16 Restricts HSV-1 Replication by Accumulating on the HSV-1 Genome, Repressing HSV-1 Gene Expression, and Directly or Indirectly Modulating Histone Modifications. *PLoS Pathogens*, *10*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004503>
- Jønsson, K. L., Laustsen, A., Krapp, C., Skipper, K. A., Thavachelvam, K., Hotter, D., Egedal, J. H., Kjolby, M., Mohammadi, P., Prabakaran, T., Sørensen, L. K., Sun, C., Jensen, S. B., Holm, C. K., Lebbink, R. J., Johannsen, M., Nyegaard, M., Mikkelsen, J. G., Kirchhoff, F., ... Jakobsen, M. R. (2017). IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/10.1038/ncomms14391>
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., De, R., Malefyt, W., Kastelein, R. A., Bazan, F., & Liu, Y.-J. (2001). Brief Definitive Report Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. In *J. Exp. Med.* (Vol. 194, Issue 6). Rockefeller University Press. <http://www.jem.org/cgi/content/full/194/6/863>
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O., & Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature Immunology*, *6*(10), 981–988. <https://doi.org/10.1038/ni1243>
- Keller, M., Rüegg, A., Werner, S., & Beer, H. D. (2008). Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion. *Cell*, *132*(5), 818–831. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.040>
- Kim, Pazhoor, & Bao. (2010). *Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells*. *107*(34), 15181–15186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006539107>
- Kleemann, R., Zadelaar, S., & Kooistra, T. (2008). Cytokines and atherosclerosis: A comprehensive review of studies in mice. In *Cardiovascular Research* (Vol. 79, Issue 3, pp. 360–376). <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn120>



- Kondo, T., Kobayashi, J., Saitoh, T., Maruyama, K., Ishii, K. J., Barber, G. N., Komatsu, K., Akira, S., & Kawai, T. (2013). *DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222694110>
- Kowalinski, E., Lunardi, T., McCarthy, A. A., Louber, J., Brunel, J., Grigorov, B., Gerlier, D., & Cusack, S. (2011). Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell*, *147*(2), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.039>
- Kranzusch, P. J., Wilson, S. C., Lee, A. S. Y., Berger, J. M., Doudna, J. A., & Vance, R. E. (2015). Ancient Origin of cGAS-STING Reveals Mechanism of Universal 2',3' cGAMP Signaling. *Molecular Cell*, *59*(6), 891–903. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.022>
- Latz, E., Verma, A., Visintin, A., Gong, M., Sirois, C. M., Klein, D. C. G., Monks, B. G., McKnight, J. C., Lamphier, M. S., Duprex, P. W., Espevik, T., & Golenbock, D. T. (2007). Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nature Immunology*, *8*(7), 772–779. <https://doi.org/10.1038/ni1479>
- Lee, M. H., Lalwani, P., Raftery, M. J., Matthaei, M., Lütke, N., Kirsanovs, S., Binder, M., Ulrich, R. G., Giese, T., Wolff, T., Krüger, D. H., & Schönrich, G. (2011). RNA helicase retinoic acid-inducible gene I as a sensor of Hantaan virus replication. *Journal of General Virology*, *92*(9), 2191–2200. <https://doi.org/10.1099/vir.0.032367-0>
- Lenardo. (1991). *Interleukin-2 programs mouse  $\alpha$   $\beta$  T lymphocytes for apoptosis*.
- Li, X., Shu, C., Yi, G., Chaton, C. T., Shelton, C. L., Diao, J., Zuo, X., Kao, C. C., Herr, A. B., & Li, P. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is Activated by Double-Stranded DNA-Induced Oligomerization. *Immunity*, *39*(6), 1019–1031. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.019>
- Liao, J. C. C., Lam, R., Brazda, V., Duan, S., Ravichandran, M., Ma, J., Xiao, T., Tempel, W., Zuo, X., Wang, Y. X., Chirgadze, N. Y., & Arrowsmith, C. H. (2011). Interferon-inducible protein 16: Insight into the interaction with tumor suppressor p53. *Structure*, *19*(3), 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.12.015>
- Liu, Cai, X., Wu, J., Cong, Q., Chen, X., Li, T., Du, F., Ren, J., Wu, Y. T., Grishin, N. v., & Chen, Z. J. (2015). Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science*, *347*(6227). <https://doi.org/10.1126/science.aaa2630>
- Liu, Loo, Y. M., Horner, S. M., Zornetzer, G. A., Katze, M. G., & Gale, M. (2012). The mitochondrial targeting chaperone 14-3-3 $\epsilon$  regulates a RIG-I translocon that mediates membrane association and innate antiviral immunity. *Cell Host and Microbe*, *11*(5), 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.006>
- Liu, Y., Li, J., Chen, J., Li, Y., Wang, W., Du, X., Song, W., Zhang, W., Lin, L., & Yuan, Z. (2015). Hepatitis B Virus Polymerase Disrupts K63-Linked Ubiquitination of STING To Block Innate Cytosolic DNA-Sensing Pathways. *Journal of Virology*, *89*(4), 2287–2300. <https://doi.org/10.1128/jvi.02760-14>
- Liu, Zhang, Wu, Ma, Wu, J., Wang, L., Jiang, Y., Fei, Y., Zhu, C., tan, rong, Jungblut, P., Pei, G., Dorhoi, A., Yan, Q., Zhang, F., Zheng, ruijuan, Liu, S., Liang, H., Liu, Z., ... Ge, B. (2018). *Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0629-6>
- Lum, K. K., Howard, T. R., Pan, C., Cristea, I. M., & Vincent Racaniello, E. R. (2019). *Charge-Mediated Pyrin Oligomerization Nucleates Antiviral IFI16 Sensing of Herpesvirus DNA* Downloaded from (Vol. 10). <http://mbio.asm.org/>
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, *108*(6), 781–794. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00671-2)

- MacKenzie, K. J., Carroll, P., Martin, C. A., Murina, O., Fluteau, A., Simpson, D. J., Olova, N., Sutcliffe, H., Rainger, J. K., Leitch, A., Osborn, R. T., Wheeler, A. P., Nowotny, M., Gilbert, N., Chandra, T., Reijns, M. A. M., & Jackson, A. P. (2017). CGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*, *548*(7668), 461–465. <https://doi.org/10.1038/nature23449>
- Mankan, A. K., Schmidt, T., Chauhan, D., Goldeck, M., Höning, K., Gaidt, M., Kubarenko, A. v, Andreeva, L., Hopfner, K., & Hornung, V. (2014). Cytosolic RNA:DNA hybrids activate the cGAS – STING axis. *The EMBO Journal*, *33*(24), 2937–2946. <https://doi.org/10.15252/embj.201488726>
- Marié, I., Durbin, J. E., & Levy, D. E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon- $\alpha$  genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. In *The EMBO Journal* (Vol. 17, Issue 22).
- Marq, J. B., Kolakofsky, D., & Garcin, D. (2010). Unpaired 5' ppp-nucleotides, as found in arenavirus double-stranded RNA panhandles, are not recognized by RIG-I. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(24), 18208–18216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.089425>
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Molecular Cell*, *10*(2), 417–426. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)
- Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., & Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, *440*(7081), 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature04516>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., & Janeway, C. A. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular Cell*, *2*(2), 253–258. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80136-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80136-7)
- Mosmann, T., Cherwinski, H., Bond, M., Giedlin, M., & Coffman, R. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Undefined*.
- Negishi, H., Fujita, Y., Yanai, H., Sakaguchi, S., Ouyang, X., Shinohara, M., Takayanagi, H., Ohba, Y., Taniguchi, T., & Honda, K. (2006). Evidence for licensing of IFN-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program (Vol. 103, Issue 41). [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0607181103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0607181103)
- Negishi, H., Taniguchi, T., & Yanai, H. (2018). *The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423>
- Ng, Y. C., Chung, W.-C., Kang, H.-R., Cho, H.-J., Park, E.-B., Kang, S.-J., & Song, M. J. (2018). A DNA-sensing-independent role of a nuclear RNA helicase, DHX9, in stimulation of NF- $\kappa$ B-mediated innate immunity against DNA virus infection. *Nucleic Acids Research*, *46*(17), 9011–9026. <https://doi.org/10.1093/nar/gky742>
- Okabe, Y., Kawane, K., Akira, S., Taniguchi, T., & Nagata, S. (2005). Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(10), 1333–1339. <https://doi.org/10.1084/jem.20051654>
- Ortaldo, J. R., Mason, A., & Rehberg, E. (1983). Effect of recombinant and hybrid recombinant human leukocyte interferons on cytotoxic activity of natural killer cells. *Journal of Biological Chemistry*, *258*(24), 15011–15015. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43764-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43764-1)
- Orzalli, M. H., Conwell, S. E., Berrios, C., DeCaprio, J. A., & Knipe, D. M. (2013). Nuclear interferon-inducible protein 16 promotes silencing of herpesviral and transfected DNA. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1316194110>
- O'Shea, J. J., Ma, A., & Lipsky, P. (2002). Cytokines and autoimmunity. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 2, Issue 1, pp. 37–45). European Association for Cardio-Thoracic Surgery.  
<https://doi.org/10.1038/nri702>
- Parvatiyar, K., Zhang, Z., Teles, R. M., Ouyang, S., Jiang, Y., Iyer, S. S., Zaver, S. A., Schenk, M., Zeng, S., Zhong, W., Liu, Z. J., Modlin, R. L., Liu, Y. J., & Cheng, G. (2012). The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nature Immunology*, 13(12), 1155–1161.  
<https://doi.org/10.1038/ni.2460>
- Patel, J. R., Jain, A., Chou, Y. Y., Baum, A., Ha, T., & García-Sastre, A. (2013). ATPase-driven oligomerization of RIG-I on RNA allows optimal activation of type-I interferon. *EMBO Reports*, 14(9), 780–787. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.102>
- Pestka, S., Krause, C. D., Walter, M. R., & Petska, S. (2004). *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>
- Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K. C., & Samuel, C. E. (1987). INTERFERONS AND THEIR ACTIONS. In *Ann. Rev. Biochem* (Vol. 56). [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- Petricoin, David, M., Fang, H., Grimley, P., Larner, A. C., & Pol3, S. vande. (1994). Human Cancer Cell Lines Express a Negative Transcriptional Regulator of the Interferon Regulatory Factor Family of DNA Binding Proteins Downloaded from. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 14, Issue 2). <http://mcb.asm.org/>
- Pisano, G., Roy, A., Ahmed Ansari, M., Kumar, B., Chikoti, L., & Chandran, B. (2017). Interferon- $\gamma$ -inducible protein 16 (IFI16) is required for the maintenance of Epstein-Barr virus latency. *Virology Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0891-5>
- Rehwinkel, J., & Gack, M. U. (2020). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 20, Issue 9, pp. 537–551). Nature Research.  
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3>
- Rello-Varona, S., Lissa, D., Shen, S., Niso-Santano, M., Senovilla, L., Mariño, G., Vitale, I., Jemaà, M., Harper, F., Pierron, G., Castedo, M., & Kroemer, G. (2012). Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle*, 11(1), 170–176. <https://doi.org/10.4161/cc.11.1.18564>
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology*, 148(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
- Roy, A., Dutta, D., Iqbal, J., Pisano, G., Gjyshi, O., Ansari, M. A., Kumar, B., & Chandran, B. (2016). Nuclear Innate Immune DNA Sensor IFI16 Is Degraded during Lytic Reactivation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV): Role of IFI16 in Maintenance of KSHV Latency. *Journal of Virology*, 90(19), 8822–8841. <https://doi.org/10.1128/jvi.01003-16>
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.-M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., Akira, S., Fujita, T., & Gale, M. (2006). *Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2*. [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)
- Saito, T., Owen, D. M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., & Gale, M. (2008). *Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA*.  
<https://doi.org/10.1038/nature07106>

- Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M. H., Uematsu, S., Yang, B. G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T., & Akira, S. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature*, *456*(7219), 264–268. <https://doi.org/10.1038/nature07383>
- Shang, G., Zhang, C., Chen, Z. J., Bai, X. chen, & Zhang, X. (2019). Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP–AMP. *Nature*, *567*(7748), 389–393. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0998-5>
- Sharma, S., DeOliveira, R. B., Kalantari, P., Parroche, P., Goutagny, N., Jiang, Z., Chan, J., Bartholomeu, D. C., Lauw, F., Hall, J. P., Barber, G. N., Gazzinelli, R. T., Fitzgerald, K. A., & Golenbock, D. T. (2011). Innate Immune Recognition of an AT-Rich Stem-Loop DNA Motif in the Plasmodium falciparum Genome. *Immunity*, *35*(2), 194–207. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.016>
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., ... Klucher, K. M. (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. In *Nature Immunology* (Vol. 4, Issue 1, pp. 63–68). <https://doi.org/10.1038/ni873>
- Stempel, M., Chan, B., Juranić Lisnić, V., Krmpotić, A., Hartung, J., Paludan, S. R., Füllbrunn, N., Lemmermann, N. A., & Brinkmann, M. M. (2019). The herpesviral antagonist m152 reveals differential activation of STING -dependent IRF and NF - $\kappa$ B signaling and STING 's dual role during MCMV infection . *The EMBO Journal*, *38*(5). <https://doi.org/10.15252/embj.2018100983>
- Stetson, D. B., Ko, J. S., Heidmann, T., & Medzhitov, R. (2008). Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. *Cell*, *134*(4), 587–598. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.032>
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., & Flavell, R. (2012). *Inflammasomes in health and disease*. <https://doi.org/10.1038/nature10759>
- Sun, H., Huang, Y., Mei, S., Xu, F., Liu, X., Zhao, F., Yin, L., Zhang, D., Wei, L., Wu, C., Ma, S., Wang, J., Cen, S., Liang, C., Hu, S., & Guo, F. (2021). A Nuclear Export Signal Is Required for cGAS to Sense Cytosolic DNA. *Cell Reports*, *34*(1), 108586. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108586>
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, *339*(6121), 786–791. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y., & Taniguchi, T. (2007). *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response*. <https://doi.org/10.1038/nature06013>
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., & Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, *11*(4), 443–451. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80119-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80119-3)
- Tanaka, N., Kawakami, T., & Taniguchi, T. (1993). Recognition DNA Sequences of Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1) and IRF-2, Regulators of Cell Growth and the Interferon System. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 13, Issue 8). <http://mcb.asm.org/>
- Unterholzner, L., Keating, S. E., Baran, M., Horan, K. A., Jensen, S. B., Sharma, S., Sirois, C. M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T. S., Fitzgerald, K. A., Paludan, S. R., & Bowie, A. G. (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunology*, *11*(11), 997–1004. <https://doi.org/10.1038/ni.1932>
- Volkman, H. E., Cambier, S., Gray, E. E., & Stetson, D. B. (2019). Tight nuclear tethering of cGAS is essential for preventing autoreactivity. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.47491>

- Wu, J. J., Li, W., Shao, Y., Avey, D., Fu, B., Gillen, J., Hand, T., Ma, S., Liu, X., Miley, W., Konrad, A., Neipel, F., Stürzl, M., Whitby, D., Li, H., & Zhu, F. (2015). Inhibition of cGAS DNA Sensing by a Herpesvirus Virion Protein. *Cell Host and Microbe*, *18*(3), 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.015>
- Xie, S., Mortusewicz, O., Ma, H. T., Herr, P., Poon, R. R. Y., Helleday, T., & Qian, C. (2015). Timeless Interacts with PARP-1 to Promote Homologous Recombination Repair. *Molecular Cell*, *60*(1), 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.031>
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., & Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, *301*(5633), 640–643. <https://doi.org/10.1126/science.1087262>
- Yan, N., Regalado-Magdos, A. D., Stiggelbout, B., Lee-Kirsch, M. A., & Lieberman, J. (2010). The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nature Immunology*, *11*(11), 1005–1013. <https://doi.org/10.1038/ni.1941>
- Yang, P., An, H., Liu, X., Wen, M., Zheng, Y., Rui, Y., & Cao, X. (2010). The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a B-catenin-dependent pathway. *Nature Immunology*, *11*(6), 487–494. <https://doi.org/10.1038/ni.1876>
- Yang, Wang, H., Ren, U., Chen, Q., & Chena, Z. J. (2017). CGAS is essential for cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(23), E4612–E4620. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705499114>
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., & Fujita, T. (2005). Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *The Journal of Immunology*, *175*(5), 2851–2858. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2851>
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., & Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*, *5*(7), 730–737. <https://doi.org/10.1038/ni1087>
- Zhang, G., Chan, B., Samarina, N., Abere, B., Weidner-Glunde, M., Buch, A., Pich, A., Brinkmann, M. M., & Schulz, T. F. (2016). Cytoplasmic isoforms of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA recruit and antagonize the innate immune DNA sensor cGAS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(8), E1034–E1043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516812113>
- Zhang, Hu, M. M., Wang, Y. Y., & Shu, H. B. (2012). TRIM32 protein modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting MITA/STING protein for K63-linked ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(34), 28646–28655. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362608>
- Zhang, Shang, G., Gui, X., Zhang, X., Bai, X., & Chen, Z. J. (2019). Structural basis of STING binding with and phosphorylation by TBK1. *Nature*, *567*(7748), 394–398. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1000-2>
- Zhang, Yuan, B., Bao, M., Lu, N., Kim, T., Liu, Y.-J., & Liu, K. & Yong-J. (2011). The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells Supplementary Information DDX41 senses intracellular DNA mediated by STING in Dendritic Cells. *Nat. Immunol*, *12*, 959–965. <https://doi.org/10.1038/ni.2091>

Zhao, M., Wang, F., Wu, J., Cheng, Y., Cao, Y., Wu, X., Ma, M., Tang, F., Liu, Z., Liu, H., & Ge, B. (2021). CGAS is a micronucleophagy receptor for the clearance of micronuclei. *Autophagy*. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1899440>

Zimmerman, L. M., Vogel, L. A., & Bowden, R. M. (2010). Commentary: Understanding the vertebrate immune system: Insights from the reptilian perspective. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 213, Issue 5, pp. 661–671). <https://doi.org/10.1242/jeb.038315>