

# Molekule kojima stanica prepoznaje virusne DNA i RNA

---

Vuković, Karmen

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:171622>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Karmen Vuković

**Molekule kojima stanica prepoznaje virusne  
DNA i RNA**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Karmen Vuković

**Cell molecules for viral nucleic acids'  
recognition**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularna biologija na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Matulić.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Molekule kojima stanica prepoznaje virusne DNA i RNA

Karmen Vuković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Organizmi imaju niz mehanizama koji služe za obranu i zaštitu od različitih patogena. Viši eukarioti imaju imunost kao sustav organa koji štiti organizam, a imunost odgovor se po svojoj prirodi dijeli na nespecifičan ili urođen i specifičan ili stečen. Urođeni imuni sustav obuhvaća prve mjere obrane od mikroorganizama, prije kontakta s njima. Stanice imaju posebne receptore koji se aktiviraju prepoznavanjem mikrobnih antigena. Receptori za prepoznavanje uzoraka (PRR) prepoznaju molekularne obrasce proteina, nukleinskih kiselina i lipida karakteristične za patogene (PAMP) te pokreću niz signalnih procesa da bi se stanica obranila od mikroba. Receptori su smješteni na površini staničnih membrana, membranskim sustavima organela unutar stanice i u citosolu. Molekule koje prepoznaju virusne nukleinske kiseline dijele se na receptore TLR, receptore RLR, receptore NLR, te receptore ALR i sintazu cGAMP. Vežanje liganda, virusne DNA ili RNA, na receptore pokreće upalne signalne kaskade reakcija što u konačnici rezultira proizvodnjom topivih medijatora upalnog odgovora, citokina i kemokina. Progresivno djelovanje aktiviranih stanica i njihovih topivih produkata ključni je element učinkovite obrane domaćina od virusne infekcije..

Ključne riječi: urođena imunost, virusne nukleinske kiseline, TLR, RLR, NLR, AIM2, cGAS, citokini

(26 stranica, 6 slika, 3 tablice, 23 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

## Cell molecules for viral nucleic acids' recognition

Karmen Vuković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Organisms have a number of mechanisms which defend them from different pathogens. Higher eukaryotes have the immune system, as a complex network of organs and biological processes that protect the organism. Immune response can be innate or nonspecific and adaptive, or specific. Innate immune system exerts the first steps of defense against microorganisms, before the contact with them. Cells have specific receptors which are activated by microbe's antigen recognition. Pattern recognition receptors (PRR) recognize molecular patterns of proteins, nucleic acids and lipids characteristic for pathogens (PAMP) and initialize a number of signaling processes to protect the cell from the microbes. Receptors are located on the surface of cell membranes, membrane systems of organelles inside the cell and in the cytosol. Molecules that recognize viral nucleic acids are classified into: TLR receptors, RLR receptors, NLR receptors, ALR receptors and cGAMP synthase. The binding of the ligand, viral DNA or RNA, to the receptors initiates inflammatory signaling cascades of reactions, which ultimately results in the production of soluble mediators of the inflammatory response, cytokines and chemokines. The progressive action of activated cells and their soluble products is a key element of effective host defense against viral infection

Keywords: innate immunity, viral nucleic acids, TLR, RLR, NLR, AIM2, cGAS, cytokines  
(26 pages, 6 figures, 3 tables, 23 references, original in: croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Antivirusni odgovor organizma.....	2
3. Membranski receptori .....	4
3.1 Receptori „toll-like“ (TLR) .....	4
4. Citoplazmatski receptori .....	7
4.1 Receptori RLR.....	7
4.2 Receptori NLR .....	10
4.3 Receptori ALR .....	12
4.4 Sintaza cGMP-AMP .....	14
5. Zaključak .....	17
6. Literatura .....	18
7. Životopis .....	20

## Kratice:

AIM2 – interferon-inducibilni protein odsutan u melanomu 2  
ALR – receptor sličan molekuli AIM2  
ASC – pomoćni protein povezan s apoptozom koji sadrži CARD  
ATP – adenzin trifosfat  
CARD – domena za aktivaciju i regrutaciju kaspaza  
cGAMP - ciklični gvanozin monofosfat – adenzin monofosfat  
IFI16 - gama-interferon-inducibilni protein  
IFN-1 – interferon tipa 1  
IL – interleukin  
IRF – faktor regulacije interferona  
ISG – geni stimulirani interferonom  
LRR – regije bogate leucinom  
MAVS – mitohondrijski antivirusni signalni protein  
MDA5 - protein 5 povezan s diferencijacijom melanoma  
NF- $\kappa$ B – jezgri faktor kappa B  
NLR – receptor sličan molekuli NOD  
NOD – domena za vezanje i oligomerizaciju nukleotida  
PAMP – molekularni obrazac pridružen patogenu  
pb – parovi baza  
PRR – receptor za prepoznavanje slijeda  
PYD – pirinska domena  
RIG – gen za indukciju retinoične kiseline 1  
RLR – receptor sličan molekuli RIG  
TGF – transformirajući faktor rasta  
TLR – receptor sličan molekuli Toll  
TNF – faktor tumorske nekroze  
STING - stimulator gena za interferone

# 1. Uvod

Virusi su metabolički neaktivne, infektivne čestice koje često predstavljaju prijetnju ljudskom zdravlju. Jednostavne su građe, jednu česticu čini nukleinska kiselina okružena proteinskom ovojnicom – kapsidom, koja nerijetko sadržava dodatni lipidni/glikoproteinski ovoj. Genetski materijal može biti deoksiribonukleinska kiselina (DNA), obično dvolančana, ili ribonukleinska kiselina (RNA), najčešće u jednolančanom obliku. Da bi kopirali svoje genome, i uopće egzistirali, virusi koriste biosintetske procese same stanice, pritom joj oduzimajući energiju. Izlaskom novosintetiziranih čestica naposljetku je uništavaju.

Zaštita od patogena je zadatak urođene i adaptivne imunosti, ali ona se pospješuje cjepivima koja su razvijena za veliki broj opasnih virusa, ili antivirusnim lijekovima koji negativno utječu na njihovu replikaciju i stvaranje novih čestica.

Zahvaljujući urbanizaciji i povećanju globalne populacije, virusi se značajno brže prenose među ljudima. Brzinu širenja virusnih infekcija uvjetuju i siromaštvo i klimatske promjene, koje sve više mijenjaju planet na kojem živimo. Većina virusa, među kojima su i virus gripe ili virus ljudske imunodeficijencije (HIV), podliježu genetičkim mutacijama, čime postižu otpornost na cjepiva i lijekove, što otežava borbu protiv njih. Neki virusi razvili su i mehanizme kojima uspješno zaobilaze obrambeni sustav organizma, čineći ih sve opasnijima za čovječanstvo.

Kao odgovor na neprestane napade virusa, ljudski organizam razvio je kompleksne strategije obrane. Velik broj proteina, adaptora i enzima sudjeluje u različitim intrinzičnim i ekstrinzičnim putevima prepoznavanja i obrane od virusa.

Cilj ovog rada je predstaviti molekule odnosno receptore imunološkog sustava koje pokreću obrambeni put stanica u dodiru s virusom. Naglasak je na molekulama koje reagiraju na virusne nukleinske kiseline, a prisutne su ili na membrani ili u citoplazmi stanica, prvenstveno imunog sustava. Osim na površini i u unutrašnjosti tih stanica, mogu se pronaći i na epitelnim stanicama tkiva izloženih utjecaju vanjskih podražaja.



## 2. Antivirusni odgovor organizma

Nespecifična ili urođena imunosna otpornost organizma predstavlja prvu liniju obrane od napada virus. Stanica prepoznaje virusne antigene na temelju detekcije konzerviranih molekularnih struktura koje se nazivaju molekularni obrasci patogena, skraćeno PAMPs (engl. *Pathogen Associated Molecular Patterns*), i karakteristične su za mikroorganizme i viruse (Singh i sur., 2021). Te strukture mogu biti lipopolisaharidi, endotoksini, peptidoglikani, flagelin i lipoteikoična kiselina kod bakterija, zatim dvolančana ili jednolančana RNA ili DNA kod virusa, uključujući sekvence bogate dinukleotidima CG i ostale ponavljajuće motive nukleinskih kiselina mikroba.

Fibroblasti, epitelne stanice i stanice urođene imunosti kao što su monociti, neutrofil i limfociti, ali i prirodne stanice ubojice ekspimiraju receptore za prepoznavanje uzoraka, PRR-s (engl. *Pattern Recognition Receptors*), koji specifično reagiraju na sljedove PAMP (Singh i sur., 2021). Budući da je uzorak koji se prepoznaje obično zajednički različitim vrstama iste skupine patogena, receptori PRR mogu prepoznati širok spektar mikroorganizama. Vežanje liganda na stanične receptore pokreće nizvodne signalne kaskade reakcija putem različitih kinaza koje aktiviraju transkripciju medijatora upale u jezgri: citokina, kemokina i dr.

Receptori za prepoznavanje uzoraka također sudjeluju u okidanju procesa stanične smrti apoptozom, piroptozom i autofagijom; kao i fagocitoze te oslobađanja citokina (Sameer i Nissar, 2021). Citokini su polipeptidi male molekulske mase koje stanice luče kao odgovor na prisutnost antigena. Glavne skupine su interferoni ( $IFN-\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ), faktori tumorske nekroze ( $TNF-\alpha$  i  $\beta$ ), transformirajući faktor rasta  $\beta$  ( $TGF \beta$ ) i interleukini (IL). Iako antigen u dodiru sa stanicom uzrokuje reakciju specifične prirode, sami citokini djeluju neovisno o porijeklu antigena. Mogu djelovati autokrino, na samu stanicu koja ih proizvede, ili parakrino na susjednu stanicu. Stanice reagiraju na otpuštene interferone povećanjem ekspresija niza gena koji se nazivaju ISG (engl. *IFN-stimulated genes*) u inficiranim i okolnim, neinficiranim stanicama, te kodiraju za proteine koji razgrađuju virusne nukleinske kiseline i induciraju apoptozu oštećenih stanica (Sparrer i Gack, 2015).

Neki ISG kodiraju za receptore PRR, čime pozitivno reguliraju odgovor zaraženih stanica, ali i senzibiliziraju zdrave stanice da pripomognu u antivirusnom odgovoru.

Interleukini posreduju u međusobnoj komunikaciji različitih limfocita pri čemu potiču proliferaciju i diferencijaciju limfocita B i T, te aktiviraju sazrijevanje hematopoetskih stanica. Primarna funkcija faktora TNF je indukcija apoptoze. Uz upalni učinak koji izaziva kao endogeni pirogen, TNF potiče regeneraciju oštećenog tkiva i sprječava tumorigenezu. TGF $\beta$  je multifunkcionalni citokin koji, uz regulaciju imunskih procesa u tijelu, sudjeluje i u diferencijaciji matičnih stanica.

Zahvaljujući prirodi svog posla, citokini predstavljaju sponu sustava urođene i stečene imunosti, te posreduju u komunikaciji obrambenih stanica. Kontroliraju stvaranje i djelovanje imunskih stanica, a po potrebi pojačavaju upalni efekt. Za razliku od citokina koji su usmjereni na regulaciju, kemokini su uključeni u migraciju leukocita (Hughes i Nibbs, 2018). Kemotaksijom ih privlače u središte infekcije, te tako sprječavaju njeno širenje po tijelu i pojavu većih posljedica zaraze.

Receptori PRR mogu se podijeliti ovisno o specifičnosti liganda, funkciji i lokalizaciji. Dijele se na membranske i citoplazmatske receptore.

### 3. Membranski receptori

Na staničnim membranama i membranskim sustavima unutar stanica postoje dvije skupine receptora koje prepoznaju strane molekule virusnog podrijetla: receptori *toll-like* (TLR) i lektinski receptori tipa C (CLR), koji su specijalizirani za vezanje ugljikohidrata na ovojnicu virusa. Receptori TLR su bili prva definirana podskupina receptora PRR. Primarno vežu virusne nukleinske kiseline, ali neki pripadnici prepoznaju i određene proteine kapside.

#### 3.1 Receptori TLR

Receptori TLR transmembranski su proteini. Dobili su naziv prema genu *toll* (njem. odlično), pronađenom kod *Drosophila melanogaster*, gdje kodira protein bitan u embrionalnom razvoju dorzo-ventralne osi, a u odraslom stadiju jedinke sudjeluje u obrani od infekcija (Volhard, 2021). Uglavnom su eksprimirani na stanicama koje prezentiraju antigene, makrofagima i dendritičkim stanicama, ali i endotelnim i epitelnim stanicama tkiva. Osim na plazmatskoj membrani, zastupljeni su i na unutarstaničnim membranskim sustavima kao što su endoplazmatski retikulum, endosomi, endolizosomi i lizosomi.

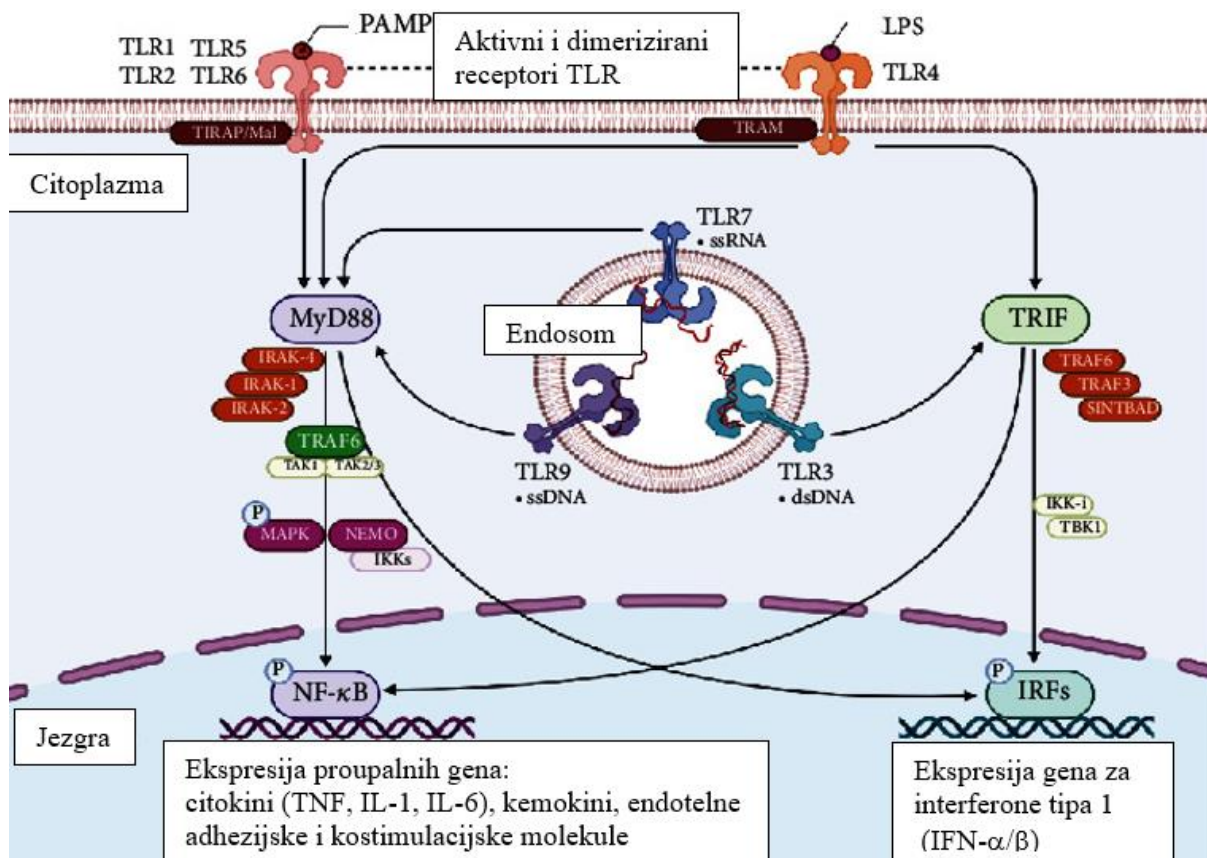
Receptori TLR čine kod ljudi porodicu od 10 članova. Klasificiraju se prema smještaju u organizmu, specifičnosti liganda i raznolikosti adaptoru. Za prepoznavanje virusa zaduženi su TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 i TLR10. TLR2 i TLR4 prepoznaju proteine ovojnice virusa, dok su ostali specijalizirani za virusne nukleinske kiseline. TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 pretežno su lokalizirani na membranama unutarstaničnih organela, što im dopušta prepoznavanje endogenih liganda. Ostali se nalaze na površini stanica te omogućuju prvi dodir sa stranim patogenima. U Tablici 1. nalazi se podjela receptora prema molekuli prepoznavanja i virusima na koje reagiraju (Singh i sur., 2021).

Svaki podtip ove skupine receptora karakteriziran je izvanstaničnom, N-terminalnom domenom s ponavljajućim sljedovima bogatim leucinom, tzv. LRR (engl. *Leucine-Rich Repeats*), koja je zaslužna za vezanje odgovarajućeg liganda. Osim ove domene, receptori imaju transmembransku i citoplazmatsku domenu TIR (engl. *Toll/IL-1 Receptor*) koja pokreće nizvodni signalni put.

Tablica 1. Podjela receptora TLR zaduženih za vezanje nukleinskih kiselina virusa prema odgovarajućim virusnim ligandima i lokaciji u stanicama. PAMP: molekularni obrazac povezan s patogenom; poliI:C: poliinozinska:policitidinska kiselina; dIRNA: dvolančana RNA; jIRNA: jednolančana RNA. Preuzeto i prilagođeno prema Singh i sur., 2021.

TLR	Lokalizacija	Virusni PAMP	Virusi
TLR3	Endosom	dIRNA, RNA, siRNA, poliI:C	Rinovirus, reovirus, virus herpesa simpleksa, virus ljudske imunodeficijencije, Epstein-Barr virus, virus gripe tipa A, virus zapadnog Nila, hepatitis C, enterovirus A71, respiratorni sincicijski virus
TLR7/8	Endosom	jIRNA	Virus gripe, hepatitis C, virus ljudske imunodeficijencije, virus bjesnoće, Cocksackie B, virus vezikularnog stomatitisa
TLR9	Endosom	Virusna DNA	Virus herpesa simpleksa, varičela zoster virus, citomegalovirus, Epstein-Barr virus, virus ljudske imunodeficijencije, hepatitis B
TLR10	Stanična membrana	Protein ovojnice, RNA	Virus gripe tipa A, virus ljudske imunodeficijencije

Vežanjem liganda za receptor TLR dolazi do konformacijske promjene – dimerizacije izvanstanične domene receptora što je okidač za vezanje nizvodnih adaptorskih proteina. Ovisno o adaptoru koji je uključen, dva su uobičajena puta signalizacije, opisana na Slici 1. Svi receptori TLR, uz izuzetak TLR3, vežu protein MyD88 (engl. *Myeloid Differentiation Factor 88*). Aktivirani receptor TLR3 veže adaptor TRIF (engl. *TIR domain-containing adaptor-inducing interferon-β*), dok aktivirani receptor TLR4 može vezati oba pomoćna proteina (Sameer i Nissar, 2021). U povezivanju receptora i adaptora sudjeluju i male pomoćne molekule: TIRAP/Mal kod MyD88, i TRAM kod vezanja TRIF-a. Na putu prijenosa signala sudjeluju i različite kinaze te drugi pomoćni proteini prikazani na Slici 1.



**Slika 1.** Glavni signalni putevi pokrenuti dimerizacijom vanstaničnih i unutarstaničnih receptora TLR. Jedan koristi pomoćni protein MyD88, dok drugi veže TRIF, no oba dovode do aktivacije transkripcijskih faktora za ekspresiju medijatora upale IFN: interferon; IRF: faktor regulacije interferona; NF- $\kappa$ B: transkripcijski faktor; PAMP: molekularni obrazac povezan s patogenom; TBK1/IKK/IRAK/MAPK/NEMO: kinaze; TLR: receptor „toll like“; TIRAP/Mal i TRAM: pomoćne molekule; TRAF6: adaptorski protein. Preuzeto i prilagođeno prema Sameer i Nissar, 2021.

Aktivacija receptora TLR mikrobnim i virusnim produktima rezultira upalnim odgovorom kojeg karakterizira proizvodnja medijatora citokina, kemokina i antimikrobnog tj. antivirusnog faktora. Potaknuti signalom receptora, aktivirani transkripcijski faktori NF- $\kappa$ B (engl. *Nuclear Factor- $\kappa$ B*) i IRF-3 (engl. *Interferon Regulatory Factor 3*) u jezgri pokreću transkripciju gena koji kodiraju za proteine uključene u upalni proces, među kojima su citokini TNF, IL-1 i IL-6, kemokini, adhezijske i kostimulacijske molekule i interferoni tipa 1, IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ . Zahvaljujući sekreciji spomenutih medijatora dolazi do pojačane reakcije urođenog i poticanja stečenog imunskog sustava za efikasnu obranu organizma (Kumar, 2018).

## 4. Citoplazmatski receptori

Četiri su skupine citoplazmatskih receptora za prepoznavanje obrazaca PAMP koji se aktiviraju na prisutnost virusa ili oštećenje stanica uzrokovano infekcijom: receptori slični molekuli RIG (RLR), receptori slični molekuli NOD (NLR), receptori slični molekuli AIM2 (ALR) i sintaza cGMP-AMP (cGAS). Citoplazmatski tj. citosolni senzori iskorištavaju ovisnost virusa o metaboličkim i replikativnim mehanizmima stanice domaćina te ih zaustavljaju u procesima sinteze novih čestica odnosno povećanja broja uzročnika zaraze.

### 4.1 Receptori RLR

Unutarstanični receptori posebno osjetljivi na virusnu RNA nazivaju se RLR ili receptori slični genu induciranom retinoičnom kiselinom 1 (RIG-1). RLR pripadaju porodici RNA helikaza ovisnih o ATP, među njima se nalaze RIG-1 (engl. *Retinoic acid-inducible Gene 1*), MDA5 (engl. *Melanoma Differentiation-associated Antigen 5*) i LGP2 (engl. *Laboratory of Genetics and Physiology 2*).

Zajednička strukturna karakteristika svih triju receptora je središnja helikazna domena DECH-box koja se sastoji od pomoćnih domena Hel-1 i Hel-2, čija se funkcija uspoređuje s ulogom rekombinaze RecA. Između njih je umetnuta regija Hel2i, koja ima helikaznu funkciju razdvajanja lanaca molekule RNA. Slijedi je C-terminalna ili represorska domena (RD) koja prepoznaje dvolančanu RNA, RNA u cirkularnom obliku, kao i krajeve dvolančane RNA s 5'-trifosfatom ili 5'-difosfatom (5' ppp – dsRNA, 5'-pp dsRNA) (Takahasi i sur., 2009). Također postoje i dvije N-terminalne domene CARD (engl. *Caspase Activation and Recruitment Domain*) kod molekula RIG-1 i MDA5, čija je uloga prijenos signala za aktivaciju IRF-3 i IRF-7 i NF-κB. To su transkripcijski faktori koji reguliraju proizvodnju citokina i posljedično utječu na preživljavanje stanica. LGP2 ne posjeduje domenu CARD pa se smatra da služi kao regulator druga dva receptora RLR. Opisana struktura receptora, njegovog regulatora i put provedbe signala prikazani su na Slici 2.

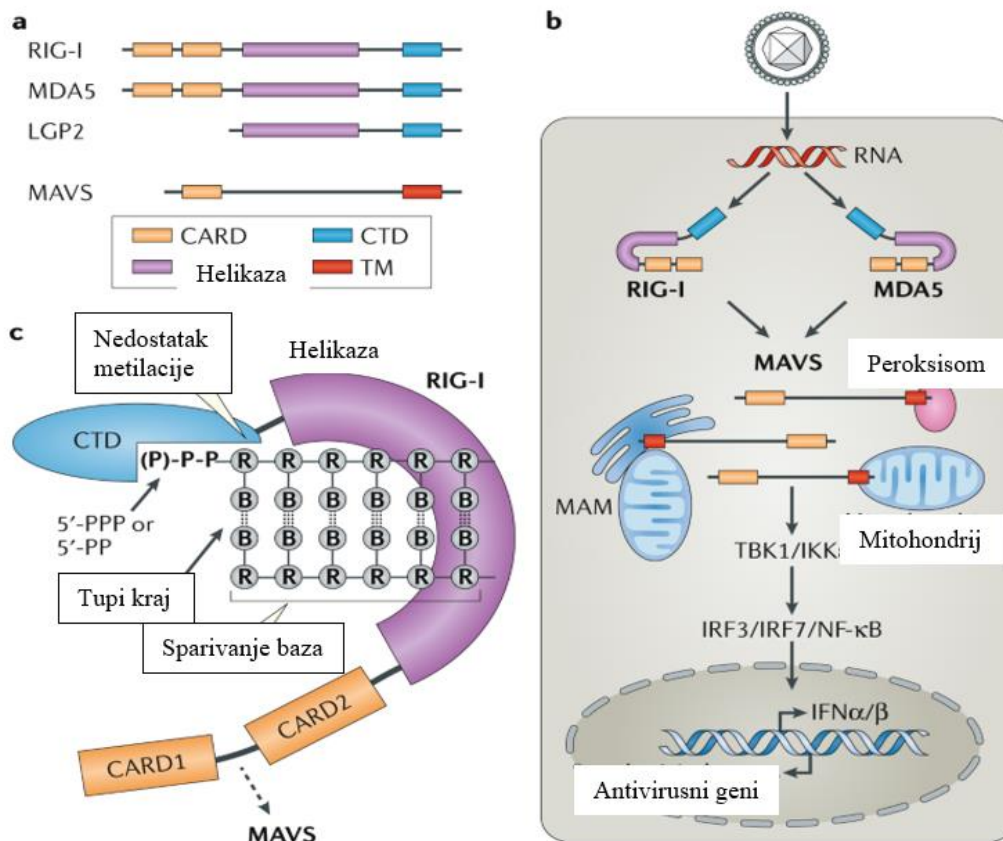
Iako su slično građeni, receptori ove skupine uglavnom prepoznaju različite viruse kao što je vidljivo u Tablici 2. RIG-1 specifičan je za fosfatne krajeve dvolančane RNA (dsRNA) i manje

cirkularne molekule RNA, dok MDA5 prepoznaje dvolančane RNA duge preko 1000 pb, bez obzira na krajeve (Ramos i Gale, 2011).

Nakon vezanja virusne RNA prepoznate po specifičnim motivima, receptori RLR mijenjaju konformaciju iz zatvorene u aktivnu s izloženim domenama CARD. Kod RIG-1 aktivna konformacija je tetramer, dok MDA5 udruživanjem s dIRNA oblikuje filament (Zheng i sur., 2014). Te strukturne promjene pokreću nizvodni signalni put koji rezultira proizvodnjom antivirusnih interferona tipa 1 i proupalnih citokina, što je prikazano na Slici 2 (Rehwinkel i Gack, 2020). Receptori reagiraju svojom domenom CARD s istoimenom domenom na adaptorskom proteinu MAVS (engl. *Mitochondrial Antiviral Signaling Protein*), koji je lokaliziran transmembranskom domenom na vanjskoj membrani mitohondrija, peroksisoma i endoplazmatskog retikuluma. MAVS pojačava signal jer pomaže u stvaranju proteinskih kompleksa (Seth i sur., 2005). Poliubikvitinacijom i fosforilacijom signalnih proteinskih molekula putem kinaza dolazi do aktivacije transkripcijskih faktora koji iniciraju stvaranje IFN-1 i drugih citokina.

Tablica 2. Ligandi specifični za receptore RIG-1 i MDA5 i virusi kojima pripadaju. PAMP: molekularni obrazac pridružen patogenu; PRR: receptor za prepoznavanje slijeda; dIRNA: dvolančana ribonukleinska kiselina; pb: parovi baza; ppp/pp: trifosfat/difosfat. Preuzeto i prilagođeno prema Singh i sur., 2021.

PRR	PAMP	Virusi
RIG-1	5' ppp dIRNA, 5'pp dIRNA, kružna RNA, jIRNA, dIRNA, RNA kodirana virusom	virus zapadnog Nila, virus denga, virus ebole, virus vezikularnog stomatitisa, Epstein-Barr virus, virus gripe A, adenovirus, rotavirus, virus bjesnoće, virus Lassa, virus Nipah, reovirus, virus ljudske imunodeficijencije, virus parainfluence, hepatitis C, virus boginja
MDA5	dIRNA, RNA (>1000 pb)	virus zapadnog Nila, virus denga, virus ospica, rotavirus, virus boginja, Cocksackie B virus, virus herpesa simpleksa, rinovirus



**Slika 2:** a) Struktura receptora RLR: RIG-1, MDA5 i LGP2; i pomoćnog signalnog proteina MAVS; b) signalna kaskada reakcija za aktivaciju transkripcije interferona, pokrenuta djelovanjem receptora RLR; c) konformacija RIG-1 u kompleksu sa stranom RNA CARD: domena za aktivaciju i regrutaciju kaspaza; CTD: represorska domena; IFN $\alpha/\beta$  - interferon  $\alpha/\beta$ ; IRF: faktor regulacije interferona; MAM: membranski sustav vezan za mitohondrije; TBK1/IKK – kinaze; TM: transmembranska domena. Preuzeto i prilagođeno prema Rehwinkel i Gack, 2020.

Uloga receptora LGP2 nije u potpunosti razjašnjena. Iako ne može samostalno prenositi signal, bez njega teško dolazi do antivirusnog odgovora. Ranije se smatralo da djeluje kao negativni regulator koji inhibira vezanje RNA za receptor RLR i inhibira regrutaciju kinaza u kompleksu s MAVS, te tako smanjuje antivirusni odgovor (Rodriguez i sur., 2014). No, dokazano je da zapravo promovira signalizaciju putem receptora RLR, pogotovo onu pokrenutu pomoću MDA5. Poboljšava prepoznavanje i učvršćuje vezu liganda i receptora, a potencijalno surađuje i s ostalim PRR u regulaciji transkripcije interferona.



## 4.2 Receptori NLR

Receptori NLR evolucijski su konzervirane molekule, eksprimirane prvenstveno u limfocitima, makrofagima, dendritičkim stanicama, ali postoje i u epitelnim stanicama. Kod ljudi su pronađene 22 skupine receptora NLR, a osim u imunološkom sustavu, sudjeluju u reprodukciji i embrionalnom razvoju (Zhong i sur., 2013). Mnoge ljudske bolesti povezane su s mutacijama i polimorfizmima u genima za te receptore, što naglašava važnost njihove uloge u obrani domaćina. Namijenjeni su uglavnom prepoznavanju antigena bakterija i gljivica, no mogu prepoznati i virusne genome.

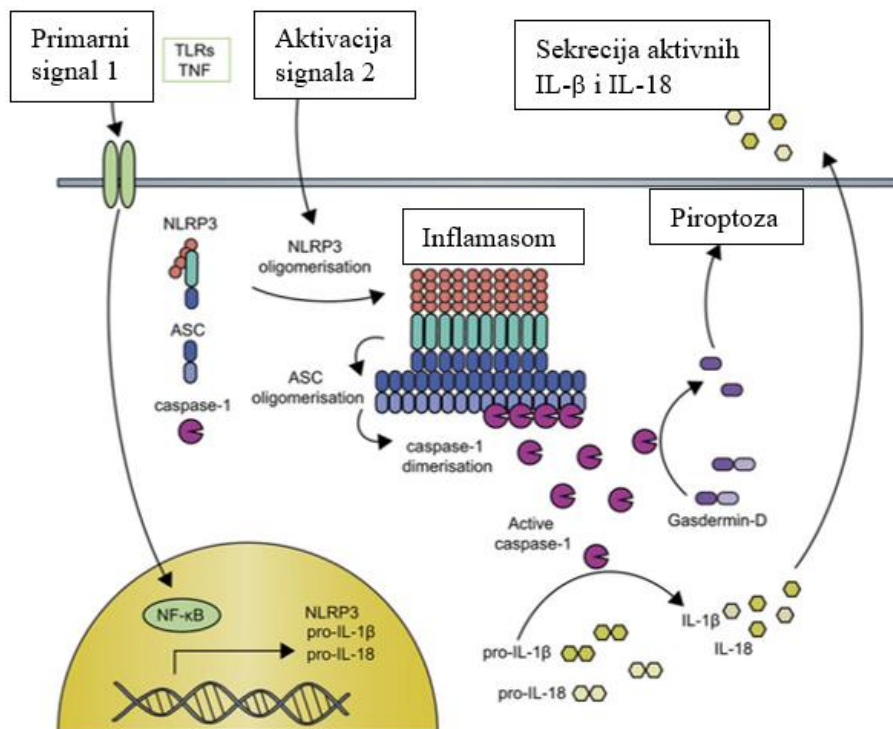
Receptori NLR u svojoj strukturi sadrže središnju domenu NOD (engl. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) ili NBD/NACHT koja je odgovorna za oligomerizaciju, C-terminalni dio s ponavljajućim sljedovima leucina (LRR) i N-terminalnu interakcijsku domenu. Domena LRR prepoznaje uzorke PAMP nukleinskih kiselina dok je N-terminalna domena bitna za interakcije protein-protein. Zbog varijabilnosti te domene, NLR se mogu podijeliti u 4 podskupine: NLRA koji sadrže kiselu transaktivacijsku domenu, NLRB koji imaju bakulovirusnu domenu za inhibiciju apoptoze, NLRC s domenom aktivacije i regrutacije kaspaza (CARD) i NLRP koji sadrže pirinsku domenu (Singh i sur., 2021).

Dolaskom odgovarajućeg signala na receptore dolazi do njihove oligomerizacije u makromolekulske komplekse i brze aktivacije efektorskih signalnih kaskada. (Zhong i sur., 2013) Domena LRR prolazi konformacijsku promjenu koja otvara interakcijsku domenu koja joj omogućuje povezivanje s pomoćnim signalnim proteinima te se stvara oligomerizacijski kompleks.

Receptori NLR dijele se i ovisno o načinu izazivanja imunološkog odgovora. Najznačajniji, i jedini otkriveni predstavnik skupine koja reagira na viruse je NLRP3. Iako je konstitutivno eksprimiran kod stanica mijeloidne loze, postoje određene molekule (LSP, TNF- $\alpha$ ), koje dodatno potiču njegovu ekspresiju te pojačavaju reakciju na signal koji potječe od vezanja pripadnih virusnih nukleinskih kiselina. Osim PAMP-ova, mogu ga pokrenuti i toksini odnosno molekule drugih parazita, ali i promjene homeostaze i oksidativna oštećenja stanice (Franchi i sur., 2009).

Kao što je shematski prikazano na Slici 3., vezanjem NLRP3 na prekursor kaspaze-1 preko pomoćnog proteina ASC (engl. *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*) nastaje inflammasom, kompleks koji cijepanjem pro-kaspaze-1 proizvodi aktivnu kaspazu-1. Zrela kaspaza-1 uzrokuje proteolitičko cijepanje prekursora proupalnih citokina IL-1 $\beta$  i IL-18 te faktora gasdermina D (Sharma i Kanneganti, 2016). N-terminalni fragment gasdermina D stvara pore na membrani stanica i omogućuje brže oslobađanje funkcionalnih interleukina, uz koje inducira smrt inficirane stanice piroptozom.

Da bi uopće došlo do nastanka inflamlasoma, u stanici je potreban određen broj prekursora kaspaze-1 i interleukina. Potaknut prethodnim signalima s drugih PRR-ova, transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B translocira se u jezgru gdje potiče ekspresiju pro-IL-1 $\beta$  i pro-IL-18 te pro-kaspaze-1, ali i povećava broj dostupnih NLRP3 u stanici. Uzimajući to u obzir, može se zaključiti da su potrebna dva različita signalna puta u aktivaciji imunosnog odgovora putem virusnog receptora NLRP3.



**Slika 3.** Primarni i sekundarni aktivacijski signalni put receptora NLRP3, kojim se postiže formiranje inflamlasoma i oslobađanje zrelih interleukina ASC: adaptorski protein; IL: interleukin; NLRP3: receptor NLR s pirinskom domenom; TLR: receptor „toll like“; TNF: faktor tumorske nekroze. Preuzeto i prilagođeno prema Coll i sur., 2016.

### 4.3 Receptori ALR

U ljudskom genomu četiri su člana porodice receptora ALR, od kojih je najvažniji protein AIM2 induciran interferonom (engl. *Absent In Melanoma 2*). AIM2 je citoplazmatski receptor prisutan u hematopoetskim stanicama, specifičan po prepoznavanju dvolančane DNA virusa i bakterija. Međutim, ovaj protein može reagirati i na DNA same stanice kod razvoja autoimunih bolesti (Man i sur., 2016). Poznato je da se AIM2 aktivira kod prisutnosti nekoliko DNA virusa (Sharma i sur., 2019), a sudjeluje i u sekreciji interleukina i tijekom zaraze RNA virusima. Interakcija je dokazana s virusima prikazanim u Tablici 3. Detalji interakcija s ostalim patogenima još uvijek se istražuju.

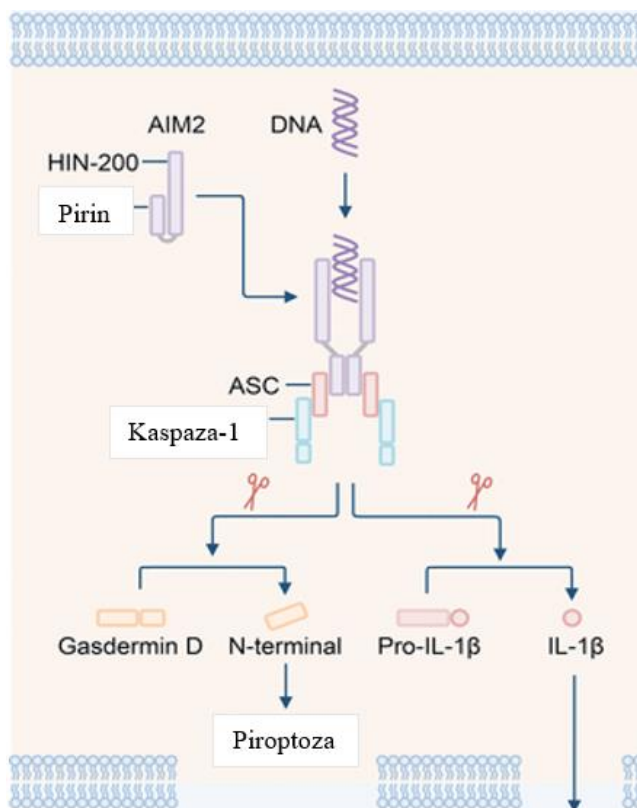
Tablica 3. Virusi koje prepoznaje receptor AIM2. Preuzeto i prilagođeno iz Sharma i sur., 2019.

Receptor	Genetski materijal virusa	Virus
AIM2	DNA	virus velikih boginja, Epstein-Barr virus, humani papiloma virus, citomegalovirus, virus herpesa simpleksa, hepatitis B
	RNA	virus zapadnog Nila, Zika virus, virus Chikungunya groznice, virus gripe tipa A, enterovirus A71

Zahvaljujući specifičnoj strukturi AIM2 jedini iz svoje grupe uzrokuje nastanak inflamasma, vezujući se s kaspazom-1 preko pomoćnog proteina ASC.

Zajednički dio strukture svih proteina ALR čini N-terminalna pirinska domena (PYD) i jedna do dvije domene C-terminalnog jezgrinog proteina HIN200. To je protein induciran interferonom, a sadrži motiv od 200 aminokiselina. Pozitivno nabijena domena HIN veže se za DNA elektrostatskim interakcijama sa šećerno – fosfatnom okosnicom, neovisno o slijedu, ali ovisno o duljini sekvence DNA, koja mora biti približno 80 pb (Jin i sur., 2012). Iako može vezati i molekule od 20 pb, potrebna je duža DNA za stvaranje funkcionalnog inflamasma. Sama domena je autoinhibitorska, te je u odsutnosti liganda vezana za susjednu domenu PYD (Jin i sur., 2013). Njenim oslobađanjem omogućena je interakcija s adaptorom ASC tj. stvaranje kompleksa AIM2-ASC-kaspaza-1 (Sharma i Kanneganti, 2016). Inflamasom, prikazan na Slici 4, potiče proteolitičko

cijepanje gasdermina D i proupalnih citokina pro-IL-1 $\beta$  i pro-IL-18 tako da nastaju zreli citokini koji onda mogu potaknuti upalni proces i piroptozu stanice.



**Slika 4.** Struktura i učinak inflammasoma AIM2-ASC-kaspaza-1, proteolitičko cijepanje interleukina i sazrijevanje faktora gasdermina D AIM2: receptor; ASC: adaptorski protein; HIN200: jezgrin protein induciran s interferonom; IL: interleukin; pro-IL: pro-interleukin. Preuzeto i prilagođeno prema Man i sur., 2016.

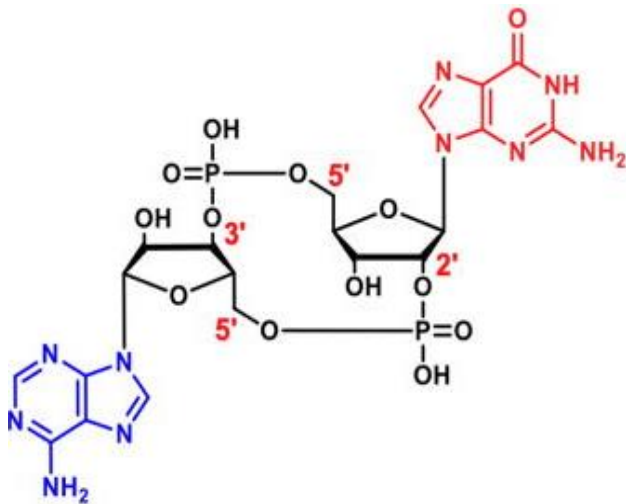
U receptore ALR još spadaju IFI16 (engl. *Gamma-interferon-inducible protein 16*), PYHIN1 (engl. *Pyrin and Hin Domain family member 1*) i MNDA (engl. *Myeloid cell Nuclear Differentiation Antigen*). Na temelju dosadašnjih istraživanja, nejasna je njihova funkcija kao receptora u stanici. Jedna je pretpostavka da ostala tri receptora iz skupine međusobno komuniciraju, reguliraju aktivnost AIM2 i pripomažu oblikovanju inflammasoma. Možda su upravo oni odgovorni za reakciju imunskog sustava na ostale mikrobe, no to zasada nije dokazano.

#### 4.4 Sintaza cGMP-AMP

Citosolni senzor DNA važan u stvaranju interferona tipa 1 je i sintaza cikličkog gvanozin monofosfat – adenzin monofosfata (cGMP-AMP), cGAS. Pripada porodici nukleotidil-transferaznih enzima i može prepoznati dvolančane molekule DNA, kako patogene tako i vlastite. Teško razlikuje DNA stranog podrijetla od molekule koja potječe iz genetskog materijala same stanice. Veže se na adenoviruse, viruse hepatitisa B, viruse ljudske imunodeficijencije, viruse herpesa simpleksa i viruse boginja (Singh i sur., 2021).

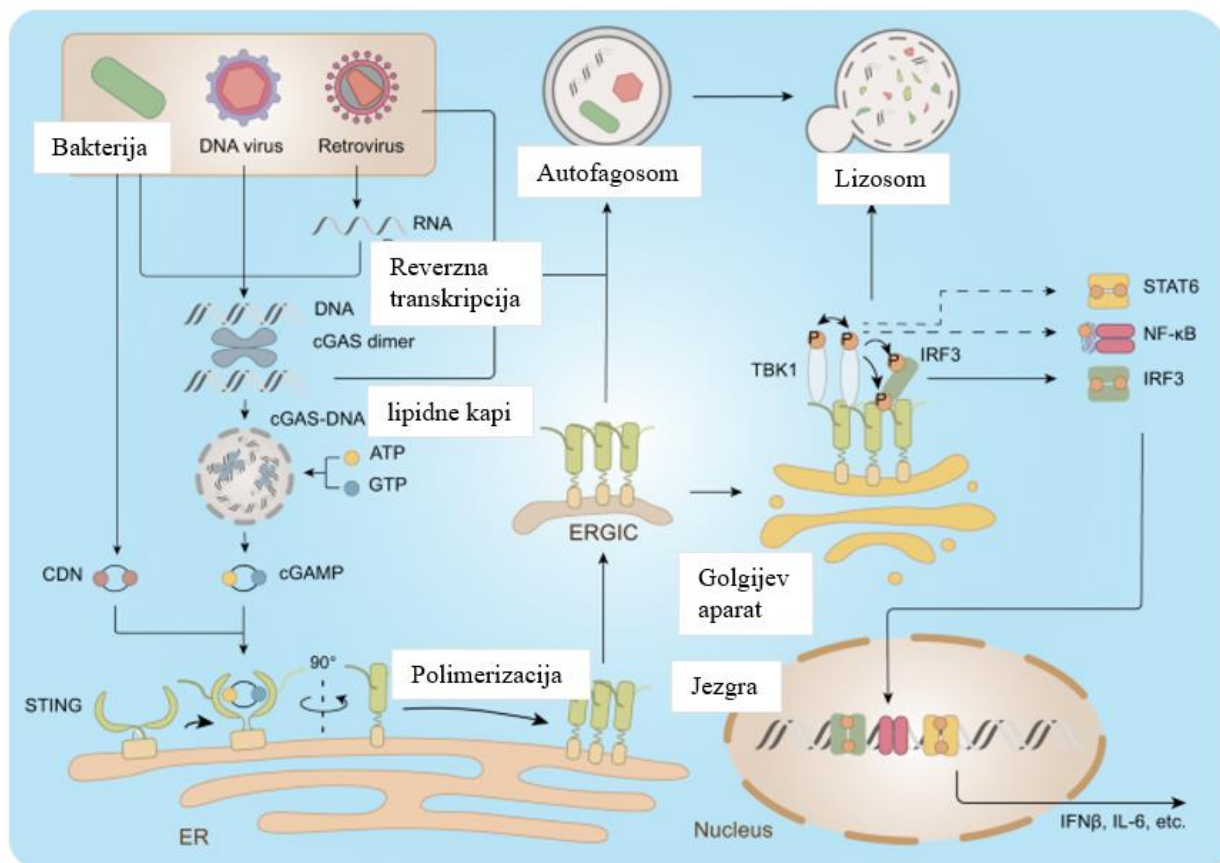
U katalitičkoj domeni sadrži pozitivno nabijena mjesta za vezanje DNA. Osnovno je mjesto A, a postoje još dva dodatna mjesta B (Decout i sur., 2021). Vezanje DNA na mjesto A rezultira konformacijskom promjenom koja omogućuje vezanje za supstrate ATP i GTP. Mjesta B učvršćuju strukturu aktivnog enzima u interakciji s DNA. Nakon koraka prepoznavanja virusne DNA, cGAS katalizira oblikovanje cikličkog dinukleotida GMP-AMP, molekule u kojoj su gvanozin i adenzin združeni 2',5' i 3',5' fosfodieterskom vezom. Reakcija se odvija unutar lipidne kapi. Nastali cGAMP, kao sekundarni glasnik, difuzijom dolazi do endoplazmatskog retikuluma gdje se veže na receptor STING, stimulator gena za interferone. Njihovim povezivanjem dolazi do konformacijske promjene: oslobađanja C-terminalne domene (CTT) i polimerizacije STING-a (Cheng i sur., 2020). Translokacijom iz endoplazmatskog retikuluma u Golgijev aparat putem membranskog sustava ERGIC (engl. *Endoplasmic-reticulum–Golgi Intermediate Compartment*) STING pokreće autofagiju. Tim procesom uklanjaju se strana DNA i čestice virusa iz citosola neovisno o otpuštanju citokina. Zbog toga se autofagija smatra primordijalnom ulogom kompleksa cGAS-STING.

Daljnim prijenosom signala dolazi do aktivacije kinaze TBK1 koja će se autofosforilirati, ali i predati fosfatnu skupinu slobodnoj domeni CTT STING-a. Takva suradnja rezultira aktivacijom transkripcijskog faktora IRF-3. Signalni put cGAS-STING potiče i aktivaciju faktora NF- $\kappa$ B i STAT6 (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 6*). Dolaskom u jezgru, aktivirani faktori omogućuju transkripciju IFN-1, IL-6 i ostalih citokina. Na kraju procesa STING odlazi se degradira u lizosomu. Slika 5. prikazuje strukturu sekundarnog glasnika, dok slika 6. prikazuje opisanu signalnu kaskadu.



**Slika 5.** Struktura cikličkog dinukleotida cGAMP. Adenozin monofosfat i gvanozin monofosfat povezani su 2',5' i 3',5' fosfodieterskom vezom. Preuzeto iz Ablasser i sur., 2013.

Da bi se signalizacija putem cGAS pokrenula potrebno je vezanje dugih sekvenci dvolančane DNA i postoji određeni prag detekcije. Takav način aktivacije pruža zaštitni mehanizam za žive stanice. Kratke dvolančane DNA mogu nastati u jezgri ili izaći iz mitohondrija nakon težeg oštećenja DNA stanice. cGAS bi se mogao aktivirati i takvim DNA, što bi moglo dovesti do razvoja autoimunih bolesti. Međutim, stanica ima i niz kontrolnih mehanizama kojima sprječava aktivaciju cGAS vlastitom DNA: stanična DNA sadrži nukleosome, locirana je u jezgri, postoji prag aktivacije cGAS i STING koji stanica može regulirati posttranslacijskim modifikacijama. S druge strane, neki su virusi razvili mehanizme obrane i inhibiraju aktivaciju proteina STING ili izbjegavaju izlaganje svoje DNA receptorima (Cheng i sur., 2020). Primjer je virus herpesa simpleksa koji degradira mRNA cGAS, čime se znatno reducira njegova enzimatska aktivnost. Jedan od proteina njegove kapside može i stabilizirati IκB kako bi spriječio oslobađanje transkripcijskog faktora NF-κB. S druge strane, virus ljudske imunodeficijencije koristi sustav prijenosa po mikrotubulima do jezgre, da bi izbjegao kolokalizaciju s ovim sustavom. Na jedan ili drugi način, virus ograničava otpor stanice i lakše prodire do jezgre.



**Slika 6.** Aktivacija citokina uz pomoć signalne kaskade sa cGAS, preko stimulatora gena za interferone STING cGAMP: ciklički gvanozin-adenozin monofosfat; cGAS: sintaza GMP-AMP; ER: endoplazmatski retikulum; IL-6: interleukin 6; IFNβ: interferon β; IRF3: faktor regulacije interferona; NF-κB: jezgreni faktor kappa B; STAT6: prijenosnik signala i aktivator transkripcije; TBK1: kinaza. Preuzeto i prilagođeno iz Cheng i sur., 2020.

## 5. Zaključak

Da bi se organizam uspješno obranio od virusne infekcije, važna je suradnja komponenta urođenog i adaptivnog imunskog sustava organizma. Prepoznavanje virusa prvi je korak u aktivaciji antimikrobnih mehanizama zaštite u stanici. Virusne nukleinske kiseline glavna su kategorija PAMP-ova koji otkrivaju njihov identitet. Na prvu liniju obrane postavljeni su receptori za prepoznavanje specifičnih obrazaca virusnih nukleinskih kiselina, PRR, među kojima se razlikuju membranski receptori iz porodice TLR, te citosolni senzori RLR, NLR, AIM2 i cGAS. Unutarstanični receptori raznolikiji su i brojniji u odnosu na površinske. Receptori se međusobno razlikuju po vezujućem ligandu i načinu signaliziranja. Za pokretanje kaskadnih reakcija uglavnom koriste drugačije pomoćne proteine. Najčešće više različitih receptora prepoznaje isti virus, što pojačava antivirusni odgovor. Receptori TLR surađuju s citosolnim receptorima RLR preko zajedničkih faktora. Provođenje signala putem NLR-a potpomognuto je prethodnom aktivacijom receptora TLR. AIM2 i NLR dijele sličan put aktivacije transkripcije, oboje stvaraju inflamatornu reakciju tijekom procesa. Sve to upućuje na međusobnu komunikaciju i usklađeno djelovanje stanica, te kompleksnost složenih unutarstaničnih sustava obrane od virusa. Aktivacija različitih receptora virusnih nukleinskih kiselina, membranskih i citosolnih, vodi sličnim posljedicama: transkripciji medijatora upale, citokina i kemokina, koji su odgovorni za efikasno uklanjanje posljedica virusne infekcije.

Međutim, nedavna istraživanja su pokazala da nenormalna aktivacija senzora unutarstaničnih nukleinskih kiselina može dovesti do razvoja autoimunih bolesti. Dosadašnja i buduća saznanja o funkciji receptora za virusne DNA i RNA bit će usmjerena na istraživanje inhibitora pretjerane i produljene imunskog reakcije, da bi se smanjila pojava autoimunih poremećaja.



## 6. Literatura

1. Ablasser, A., Goldeck, M., Cavlar, T. et al. (2013) cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 498, 380–384
2. Cheng, Z., Dai, T., He, X. et al. (2020) The interactions between cGAS-STING pathway and pathogens. *Sig Transduct Target Ther.* *Nature* 5, 91.
3. Coll, R., O'Neill, L., Schroder, K. (2016). Questions and controversies in innate immune research: what is the physiological role of NLRP3?. *Cell Death Discovery.* 2.16019.
4. Decout, A., Katz, J.D., Venkatraman, S. et al. (2021) The cGAS–STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 21, 548–569.
5. Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. (2009) Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev.* 227(1):106-28.
6. Hughes, C. E., Nibbs, R. (2018) A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal.* 285(16), 2944–2971.
7. Jin, T., Perry, A., Jiang, J., Smith, P., Curry J.A., Unterholzner, L., Jiang, Z., Horvath, G., Rathinam, V.A., Johnstone, R.W. (2012) Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity.* 36:561–571.
8. Jin, T., Perry, A., Smith, P., Jiang, J., Xiao, T.S. (2013) Structure of the absent in melanoma 2 (AIM2) pyrin domain provides insights into the mechanisms of AIM2 autoinhibition and inflammasome assembly. *J. Biol. Chem.* 288: 13225–13235.
9. Kumar, V. (2018) Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *International Immunopharmacology,* 59: 391-412.
10. Man, S.M., Karki, R., Kanneganti, T.-D. (2016) AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur. J. Immunol.,* 46: 269-280.
11. Ramos, H. J., Gale, M. Jr. (2011) RIG-I like receptors and their signaling crosstalk in the regulation of antiviral immunity, *Curr. Opin. Virol.* Vol. 1, 167-176.
12. Rehwinkel, J., Gack, M.U. (2020) RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol* 20, 537–551.

13. Rodriguez, K. R., Bruns, A. M., Horvath, C. M. (2014) MDA5 and LGP2: accomplices and antagonists of antiviral signal transduction. *Journal of virology*, 88(15), 8194–8200.
14. Sameer, A. S., Nissar, S. (2021) Toll-like receptors (TLRs): Structure, functions, signaling, and role of their polymorphisms in colorectal cancer susceptibility. *Biomed Res Int*. 1157023.
15. Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., Chen, Z. J. (2005) Identification and characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF3. *Cell*, 122, 669-682.
16. Sharma, D, Kanneganti, TD. (2016) The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol*, 213: 617-629.
17. Sharma, B. R., Karki, R, Kanneganti, T. D. (2019) Role of AIM2 inflammasome in inflammatory diseases, cancer and infection. *Eur J Immunol*. 49(11):1998-2011.
18. Singh, H., Koury, J., Kaul, M. (2021) Innate immune sensing of viruses and its consequences for the central nervous system. *Viruses*, 13, 170.
19. Sparrer, K. M., Gack, M. U. (2015) Intracellular detection of viral nucleic acids. *Curr Opin Microbiol*. 26:1-9.
20. Takahashi, K., Kumeta, H., Tsuduki, N., Narita, R. et al. (2009) Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: Identification of the RNA recognition loop in RIG-1-like receptors. *J. Biol. Chem*. 284:17465-17474.
21. Volhard, C. N. (2021) The Toll gene in *Drosophila* pattern formation. Review series: Revisiting discoveries that transformed genetics. *Trends in genetics*, 38, 231-245.
22. Zheng, J., Yong, H. Y., Panutdaporn, N., Liu, C., Tang, K., Luo, D. (2014) High-resolution HDX-MS reveals distinct mechanisms of RNA recognition and activation by RIG-I and MDA5. *Nucleic Acids Res*. 43(2):1216-30.
23. Zhong, Y., Kinio, A., Saleh, M. (2013) *Frontiers in Immunology: Functions of NOD-like receptors in human diseases*. Vol.4.

## Životopis

Rođena u Splitu, 08. 11. 2000. Osnovnoškolsko obrazovanje završila u Osnovnoj školi Jesenice – Dugi Rat, nakon čega sam upisala Zdravstvenu školu Split, smjer farmaceutski tehničar. Nakon završetka srednje škole i stečenog zvanja farmaceutskog tehničara, 2019. odabirem Preddiplomski studij Molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.