

УДК 616.9-002-007.1:577.171.6:578.76:543.544.164:612.017.11

АБАТУРОВ А.Е.<sup>1</sup>, ВОЛОСОВЕЦ А.П.<sup>2</sup>, ЮЛИШ Е.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ГУ «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины»

<sup>2</sup>Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев

<sup>3</sup>Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

## РОЛЬ RIG-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕКОГНИЦИИ ПАТОГЕН-АССОЦИИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР ИНФЕКЦИОННЫХ ПАТОГЕННЫХ АГЕНТОВ И РАЗВИТИИ ВОСПАЛЕНИЯ. ЧАСТЬ 2. ЛИГАНДЫ RLR И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С RLR

**Резюме.** В обзоре охарактеризованы механизмы участия протеинов RIG-подобных рецепторов в регуляции процесса воспаления и иммунного ответа.

**Ключевые слова:** воспаление, инфекционный процесс, RIG-подобные рецепторы.

### Лиганды RLR

Геликазы RIG-1 и MDA-5 являются высокодифференцированными сенсорами вирусной РНК [59, 85]. Геликаза RIG-1 распознает одноцепочечные РНК (оцРНК), характеризующиеся наличием трифосфатных группировок в их 5' конце (5'ppp-оцРНК) [4]. Первоначально в связи с тем, что синтез РНК при помощи РНК-полимераз происходит с использованием нуклеозидтрифосфатов, у всех молекул РНК в их 5' конце содержится трифосфатный мотив. В дальнейшем процессинге синтезируемой РНК макроорганизма происходит удаление 5'ppp и сворачивание РНК в комплексные вторичные структуры, поэтому наличие в цитоплазме клетки экспонированных 5'ppp-оцРНК является характерным признаком вирусных двуцепочечных РНК (дцРНК) [7]. Относительно недавно было показано, что наличие 5'ppp является важным, но не обязательным условием активации RIG-1 [42, 68, 57, 59]. Однако, по мнению Jan Rehwinkel и соавт. [57, 59], 5'ppp-оцРНК является единственным естественным оцРНК-ассоциированным лигандом RIG-1.

Геликаза RIG-1 также участвует в рекогнициии относительно коротких дцРНК (в пределах от 21 до 27 нуклеотидов), 3'-ОН- (3'-гидроксильных) и 5'-ОН-монофосфатов дцРНК [68]; фрагментов РНК, образующихся в результате противовирусного действия активированной RNase L [70]; регионов, обогащенных поли-U/UC (uridine-rich poly), генома вирусного гепатита С [56, 83]. В отличие от

RIG-1 продукт гена MDA-5 распознает относительно длинные дцРНК (более 2 КБ) (рис. 1). Предполагают, что продукт MDA-5 является доминирующим цитоплазматическим рецептором для полимера РНК поли-(I:C) (polyinosine-polycytidylic) как *in vitro*, так и *in vivo* [56].

Протеин RIG-I распознает РНК ортомиксовирусов (вируса гриппа) [2, 53], парамиксовирусов (вируса парагриппа I (вируса Сендай и гемадсорбирующего вируса НА-2) и III типов) [62], метаневмовируса [14], респираторно-синцитиального вируса [81], вируса гепатита С [55, 63, 64], краснухи, вируса простого герпеса 1, Эпштейна — Барр вируса [7], вируса везикулярного стоматита [85], японского энцефалита [18], вируса бешенства [1]. В исследованиях, проведенных в последнее время, было показано, что RIG-I участвует в рекогнициии и ДНК-содержащих вирусов (вируса Эпштейна — Барр, вируса простого герпеса 1, аденовируса), бактерий (*Legionella pneumophila*), и синтетической В-формы ДНК поли-(dA:dT) [15, 60].

Геликаза MDA-5 взаимодействует с РНК пикорнавирусов, таких как вирус энцефаломиокардита, менговирус и норовирус [18, 24, 43]. Возможно, что MDA5 участвует в распознавании дцРНК значительно большего спектра вирусных агентов [44].

© Абатуров А.Е., Волосовец А.П., Юлиш Е.И., 2013

© «Здоровье ребенка», 2013

© Заславский А.Ю., 2013

РНК реовируса и вируса Западного Нила распознаются RIG-I и MDA-5 (рис. 2) [21, 26, 34].

### Рекогниция лигандов RLR

Геликазы RIG-1 и MDA-5 в неактивированной клетке существуют как аутоингибированные, «закрытые» молекулярные структуры, маскирующие эффекторные CARD домены.

Взаимодействие геликаз RIG-1 и MDA-5 с цитоплазматически расположенной вирусной дцРНК происходит независимо друг от друга и сопровождается димеризацией и индукцией их АТФазной активности (рис. 3) [25].

Инициализация димеризации и открытие CARD доменов для дальнейших CARD-CARD взаимодействий с адаптерной молекулой IPS-1 связано с конформационным изменением пространственной структуры геликазных молекул (рис. 4) [54, 86].

Однако, согласно данным Darja Vamming и Curt M. Horvath [5], уровень продукции IFN I типа, индуцированной MDA-5 или RIG-1, независим от деятельности каталитической области геликазы. Michaela U. Gack и соавт. [52] было установлено, что после рекогниции вирусной РНК аминокислотный остаток Lys<sup>172</sup> RIG-1 подвергается

TRIM25-опосредованному убиквитинированию, предопределяя дальнейшее взаимодействие с адаптерной молекулой IPS-1 и трансдукцию сигнала возбуждения. В то время как фосфорилирование аминокислотного остатка Thr<sup>170</sup>, который расположен в непосредственной близости к Lys<sup>172</sup>, подавляет функциональную активацию RIG-1. Геликазы RIG-1 и MDA-5 возбуждают внутриклеточные сигнальные пути, которые активируют такие факторы транскрипции, как IRF-3, IRF-7 и NF-κB [22, 64].

До недавнего времени LGP2 считали исключительно ингибирующим фактором. Предполагалось, что геликаза LGP2, связываясь с дцРНК, препятствует активации RIG-1 и MDA-5 и в связи с отсутствием в ее молекулярной структуре CARD доменов сама не вызывает возбуждения продукции IFN I типа [77], а также ингибирует мультимеризацию RIG-1 и MDA-5 [56]. Однако несколькими исследовательскими группами было показано, что LGP2 является не отрицательным, а положительным регулятором RLR-индуцированного возбуждения [40]. Структурные исследования С-терминального домена LGP2, проведенные Kiyohiro Takahasi и соавт. [68], показали, что геликаза LGP2 образует более

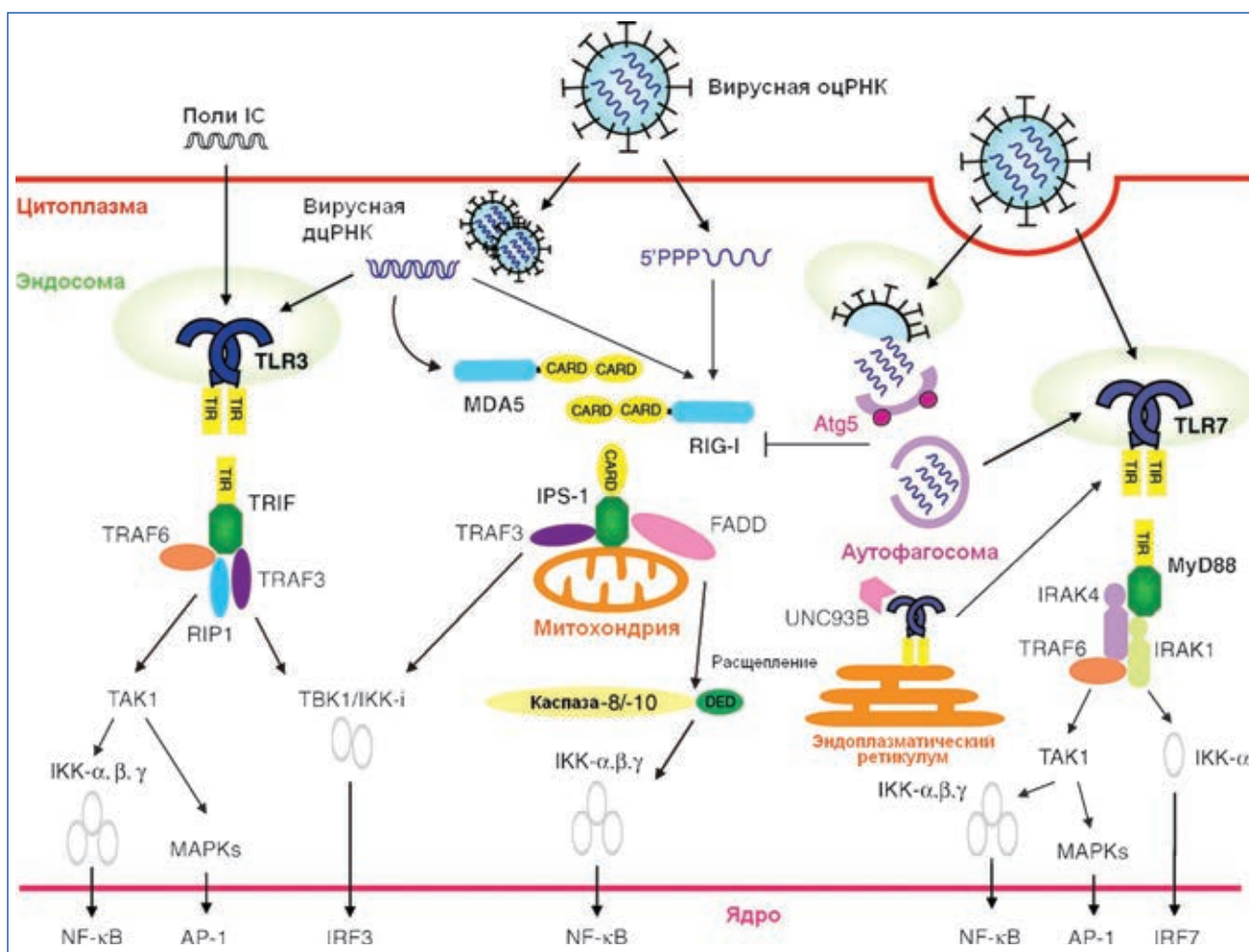


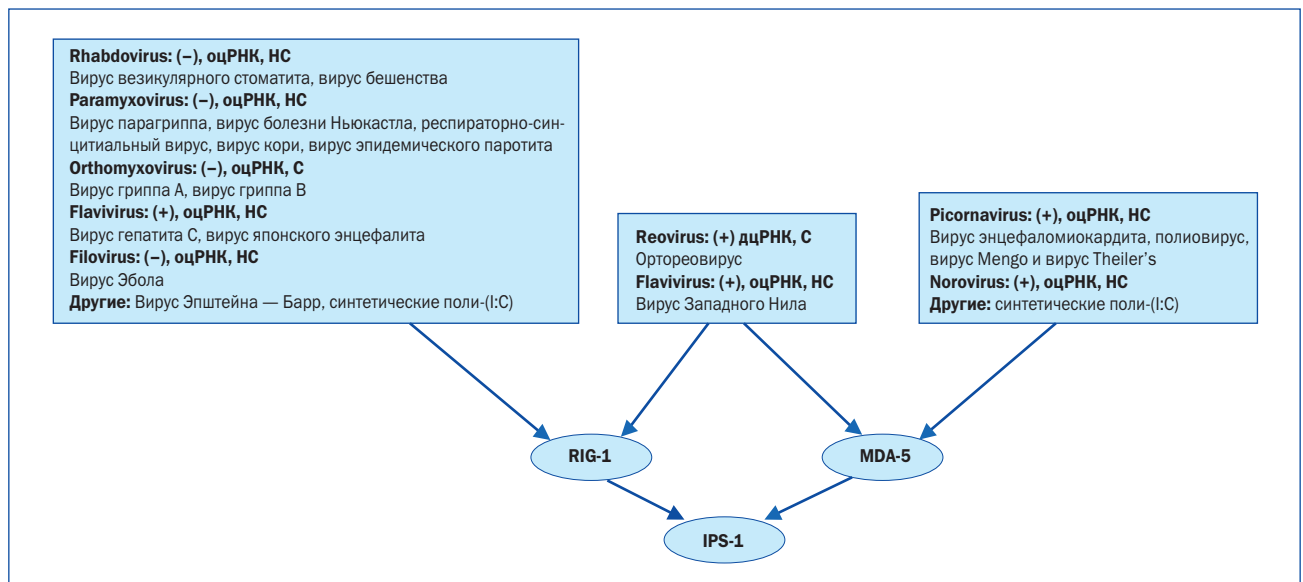
Рисунок 1. Сенсоры нуклеиновых кислот и их внутриклеточные сигнальные пути [38]

тесные связи с дцРНК, чем MDA-5. Diana A. Pippig и соавт. [76] предложили модель функционирования LGP2, согласно которой LGP2 и RLR взаимодействуют между собой С-терминальными доменами, обуславливая «раскрытие» CARD доменов (рис. 5).

Образование функционального комплекса LGP2/MDA-5 способствует увеличению возможностей рекогниции, в частности, комплекс LGP2/MDA-5 может взаимодействовать с более значительным разнообразием фрагментов дцРНК, чем MDA-5 [76]. Учитывая, что протеин LGP2, изменяя внутриклеточную локализацию вирусного рибонуклеопротеина (RNP) или раскручивая комплексные структуры РНК, облегчает рекогницию дцРНК преимущественно геликазой MDA-5, Takashi Satoh и соавт. [40] считают, что участие LGP2 особенно важно для рекогниции РНК пикорнавирусов.

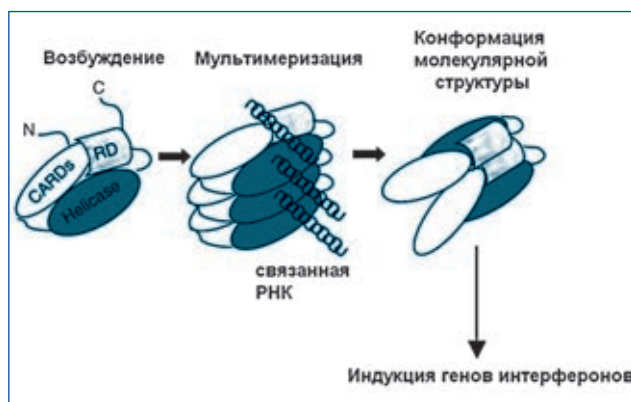
### Внутриклеточные сигнальные пути RLR

Практически одновременно в 2005 году четыре независимые группы исследователей Taro Kawai и соавт. [35], Etienne Meylan и соавт. [11], Rashu B. Seth и соавт. [67], Liang-Guo Xu и соавт. [84] идентифицировали адаптерную молекулу RIG-1 и MDA-5 — CARD-содержащий стимулятор 1 промотора гена IFN-β. Каждая группа исследователей дала свое название этой молекуле: Taro Kawai и соавт. [35] — IPS-1, Etienne Meylan и соавт. [11] — Cardif, Rashu B. Seth и соавт. [67] — MAVS, Liang-Guo Xu и соавт. [84] — VISA. Структура адаптерной молекулы IPS-1, которая состоит из 540 аминокислотных остатков, характеризуется наличием N-терминального CARD домена и С-терминальной трансмембранной митохондриальной последовательности, связывающей



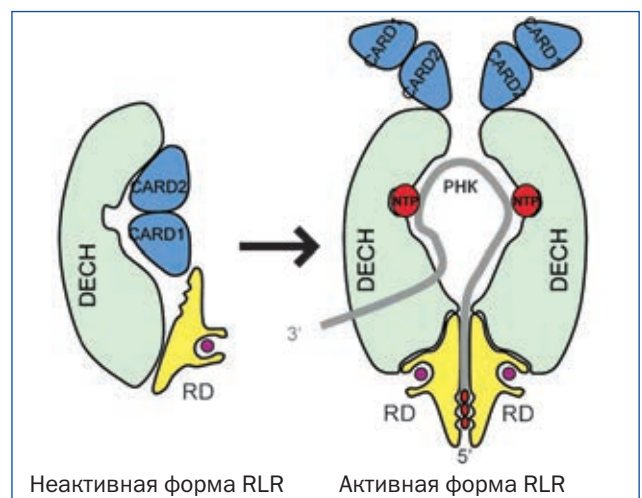
**Рисунок 2. Модель участия RIG-1 и MDA-5 в рекогниции различных вирусных агентов [21, с дополнениями]**

**Примечание:** характеристика геномных особенностей вирусов: (+) — с положительным смыслом, (-) — с отрицательным смыслом; оцРНК — одноцепочечная РНК, дцРНК — двуцепочечная РНК; С — сегментированный, НС — несегментированный геном.



**Рисунок 3. Модель активации RLR [85]**

**Примечание:** активация RLR происходит в три этапа — от мономерной неактивной формы (слева) к РНК-связанной димерной форме (центральная фигура) и к конечной активной форме (справа).



**Рисунок 4. Конформационные изменения молекулы RIG-1 при взаимодействии с РНК [73]**



молекулу с внешней мембраной митохондрии. IPS-1 является частью макромолекулярного сигнального комплекса [47]. На митохондриальной мембране IPS-1 находится в непосредственной связи с митофузином 1, что позволяет считать IPS-1 активным участником процесса ассоциации митохондрии и эндоплазматического ретикула, необходимого для трансдукции сигнала [12]. Адаптерная молекула

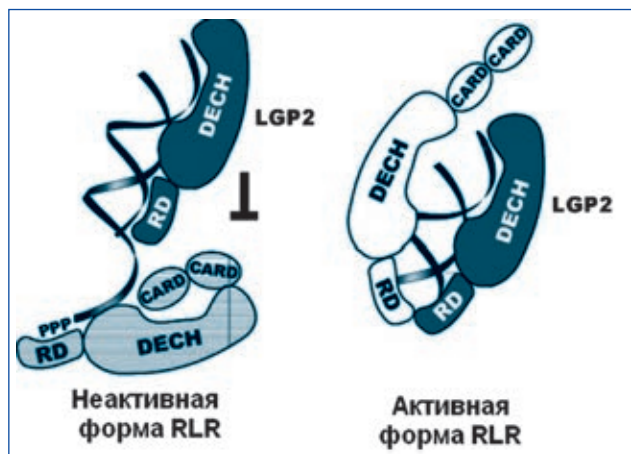


Рисунок 5. Роль LGP2 в процессе активации RLR [76]

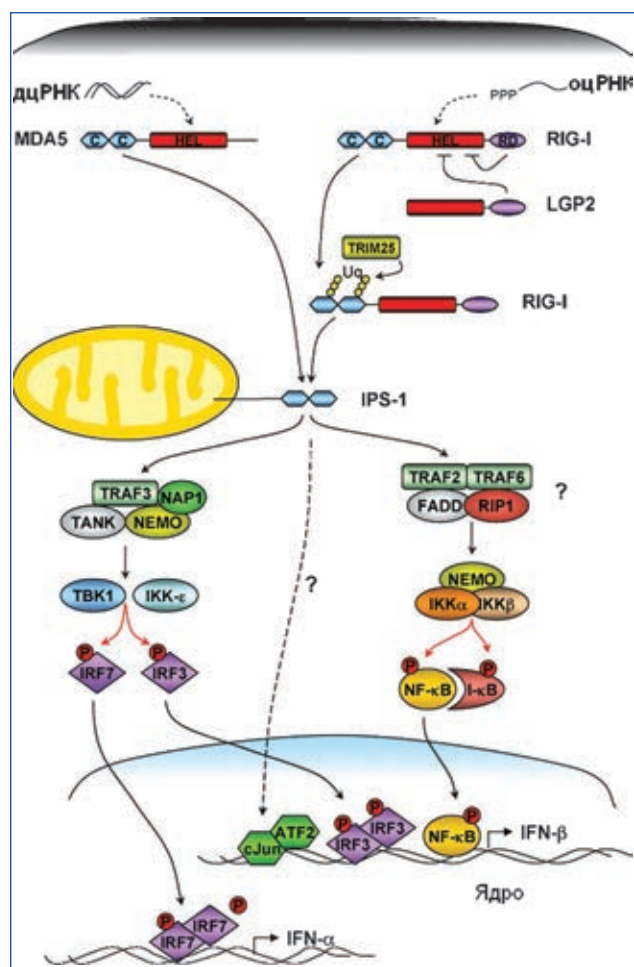


Рисунок 6. Внутриклеточные молекулярные сигнальные пути RLR [82]

IPS-1 после CARD-CARD взаимодействия с RLR в состоянии вызвать IRF-3-, IRF-7- и NF-κB-зависимую активность генов. Дефицит экспрессии IPS-1 сопровождается низким противовирусным ответом [33, 78].

Активация RIG-1 и MDA-5 вирусной дцРНК приводит к раскручиванию вирусной РНК и конформационным изменениям молекул RIG-1 и MDA-5, что обуславливает их взаимодействие с IPS-1 [34]. Активированный IPS-1 может взаимодействовать с несколькими сигнальными (TRAF3, TRAF6, TRADD, RIP1, FADD, RIP1 и каспазами 8–10), регулируемыми и другими молекулами [31, 79, 88].

После CARD-CARD взаимодействия как с RIG-1, так и с MDA-5 протеин IPS-1 может как рекрутировать TRAF3, так и вступать во взаимодействие с TRADD (tumor necrosis factor receptor 1-associated death domain protein). Индуцированная TRAF3 обуславливает возбуждение TANK/NAP1/SINTBAD и TBK1, которые, в свою очередь, фосфорилируют факторы транскрипции IRF-3 и IRF-7. Взаимодействие адаптерной молекулы IPS-1

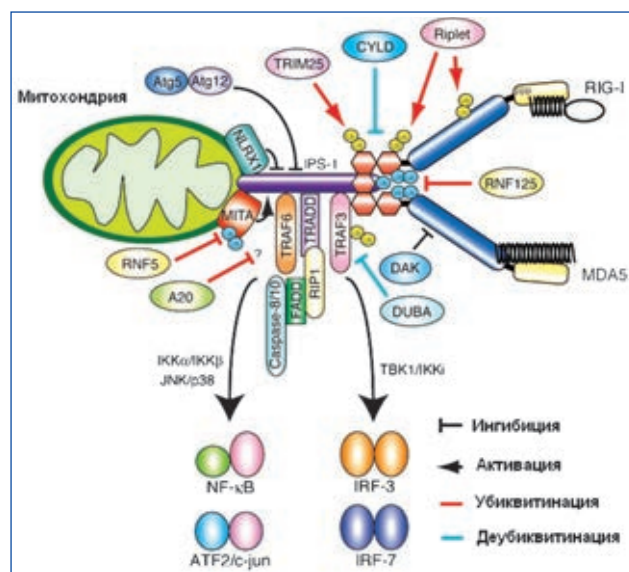


Рисунок 7. Регуляция активности RLR-ассоциированного возбуждения [87]

Примечание: митохондриальные белки при помощи неизвестных механизмов регулируют IPS-1-опосредованный сигнал: MITA усиливает, а NLRX1 подавляет возбуждение. Активность MITA ингибируется RNF5-опосредованным Lys-48-связанным полиубикитинированием. Комплекс Atg5-Atg12, который является основным компонентом аутофагии, снижает активность RIG-1-ассоциированного возбуждения. TRIM25 и Riplet/RUEL независимо конъюгируют Lys-63-связанные убикитины на молекуле RIG-1 и усиливают RIG-1-сигнал. Протеин RNF125 является ингибирующим фактором RLR-ассоциированного возбуждения IPS-1. Он способствует Lys-48-связанному полиубикитинированию RIG-1, MDA-5 и IPS-1, что ингибирует их деятельность. A20 и DUBA, обуславливая деубикитинирование TRAF6 и TRAF3, соответственно, ингибируют RIG-1-связанное возбуждение.

с TRADD активирует сигнальную цепь TRADD/TRAF6/TRAF2/RIP1/FADD/каспаза 8–10/NEMO/TANK/IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ , обуславливая активацию фактора транскрипции NF- $\kappa$ B (рис. 6) [35, 44, 49, 70]. Также было установлено, что рекрутирование TRADD может сопровождаться возникновением макромолекулярного комплекса, включающего в себя убиквитин E3 лигазу (паркин), TRAF3, TANK, FADD, RIP1. Данное макромолекулярное образование получило название «иннаеосома». Индуцирующие потенции иннаеосомы в отношении факторов транскрипции IRF3 и NF- $\kappa$ B превосходят все известные молекулярные активаторы [27]. Адаптерная молекула IPS-1 также обладает проапоптотическим действием, так как обуславливает изменение митохондриального мембранного потенциала и активирует каспазы [65, 75].

Геликаза RIG-1 в отличие от MDA-5 взаимодействует с молекулярным стимулятором интерфероновых генов STING, который локализован на мембране эндоплазматического ретикула и обладает способностью индуцировать такие факторы транскрипции, как NF- $\kappa$ B, IRF-3 [36, 46].

После фосфорилирования и димеризации факторы транскрипции IRF транслицируются в ядро клетки, где ассоциируются с коактиватором p300/CBP, образуя комплекс IRF/CBP/p300, и связываются с сайтом ISRE промотора ISG. Для TLR-независимого пути активации генов IFN основными факторами транскрипции являются гомодимер IRF-7/IRF-7, гетеродимер IRF-3/IRF-7

[28]. Факторы транскрипции IRF-3 и IRF-7 индуцируют синтез IFN I типа, которые активируют экспрессию сотен ISG, обуславливая продукцию протеинов с противовирусным действием, провоспалительных цитокинов, матурацию незрелых дендритных клеток, активацию эффекторных T-лимфоцитов [64].

Рассматривая в целом вклад RLR в продукцию IFN I типа, необходимо отметить, что активация RLR сопровождается продукцией IFN I типа эпителиоцитами, макрофагами, дендритными клетками, фибробластами, а основные продуценты IFN- $\alpha$ , которыми являются плазматоидные дендритные клетки (DC), продуцирующие до 90 % всего IFN- $\alpha$  в организме человека, реагируют не на RLR-, а на TLR-ассоциированное возбуждение. В частности, взаимодействия вирусной дцПНК с TLR-3, протеина F респираторно-синцитиального вируса — с TLR-4, вирусной оцПНК — с TLR-7 и TLR-8, CpG бактериальной и вирусной ДНК — с TLR-9 сопровождается продукцией IFN- $\beta$  [30, 45]. Также считают, что некоторые вирусные компоненты непосредственно могут связываться с *cis*-активными вирус-реагирующими элементами (VRE) промоторов генов IFN- $\beta$ , IFN- $\alpha$  и возбуждать их транскрипцию [6]. Плазматоидные DC играют особую роль в раннем интерфероногенезе. TLR-7 и TLR-9 чрезвычайно высоко экспрессированы в плазматоидных DC. Взаимодействие вирусной оцПНК с TLR-7 и ДНК с TLR-9 приводят к немедленной активации внутриклеточных молекулярных пу-

**Таблица 1. Внутриклеточные ингибиторы RLR сигнального пути [2, 37]**

Ингибиторы	Целевые молекулы	Механизм действия	Тип ингибиции
<i>Ингибиторы RIG-I-ассоциированного возбуждения</i>			
CYLD	RIG-I, TBK1	Деубиквитинирование RIG-I	Ингибиция устойчивого и активного состояния
ISG15	RIG-I	Секвестрация RIG-I	Отрицательная обратная связь (RIG-I)
LGP2	дцПНК, RIG-I/IPS-1 комплекс	Секвестрация дцПНК, конкуренция с RIG-I, ингибиция димеризации RIG-I	Отрицательная обратная связь (RLR)
<i>Ингибиторы MDA-5-ассоциированного возбуждения</i>			
DAK	MDA-5	Секвестрация MDA-5	Ингибиция устойчивого состояния (MDA-5)
<i>Ингибиторы RIG-I и MDA-5-ассоциированного возбуждения</i>			
A20	Неизвестно	Деубиквитинирование целевых протеинов	Отрицательная обратная связь (RLR, TLR)
Atg5-Atg12	RIG-I, MDA-5, IPS-1	Секвестрация RLR и IPS-1	Ингибиция устойчивого состояния (RLR)
DUBA	TRAF3	Деубиквитинирование TRAF3	Отрицательная обратная связь (RLR, TLR)
NLRX1	IPS-1	Конкуренция с RLR	Ингибиция устойчивого состояния (RLR)
Pin1	IRF-3	Зависимая от фосфорилирования изомеризация	Отрицательная обратная связь (RLR, TLR)
SIKE	TBK1 и IKK $\epsilon$	Секвестрация киназ	Ингибиция устойчивого состояния (RLR, TLR)
RNF125	RIG-I, MDA-5, IPS-1	Протеосомная деградация RLR и IPS-1	Отрицательная обратная связь (RLR)

тей, которые, обуславливая фосфорилирование и транслокацию фактора транскрипции IRF-7 в ядро клетки, индуцируют экспрессию гена IFN- $\alpha$  [10, 16, 72].

Однако плазматоидные DC начинают продукцию IFN- $\alpha$  только в том случае, если первая макрофагальная линия защиты исчерпывает свои возможности синтеза IFN [69].

Активация RIG-1 в Treg клетках блокирует их ингибирующую функцию [32].

### Регуляция активности RLR-ассоциированного возбуждения

Ограничение продукции IFN — необходимый физиологический процесс саногенеза острых

инфекционных воспалительных заболеваний. Для осуществления ингибирования продукции IFN в макроорганизме функционирует несколько точно отрегулированных механизмов, которые предупреждают развитие хронических IFN-ассоциированных процессов.

Одним из ингибирующих регуляторов активности RIG-1 и MDA-5 является LGP2 [77, 78]. Протеин LGP2 функционирует как лигандсеквестирующий рецептор, конкурирующий с протеинами RIG-1 и MDA-5 за взаимодействие с вирусной дцРНК. Таким образом, протеин LGP2 может быть не только положительным, но и отрицательным регулятором передачи сигналов возбуждения с внутриклеточных цитоплазматических геликазных рецепторов. Высокая экспрессия LGP2 подавляет избыточную

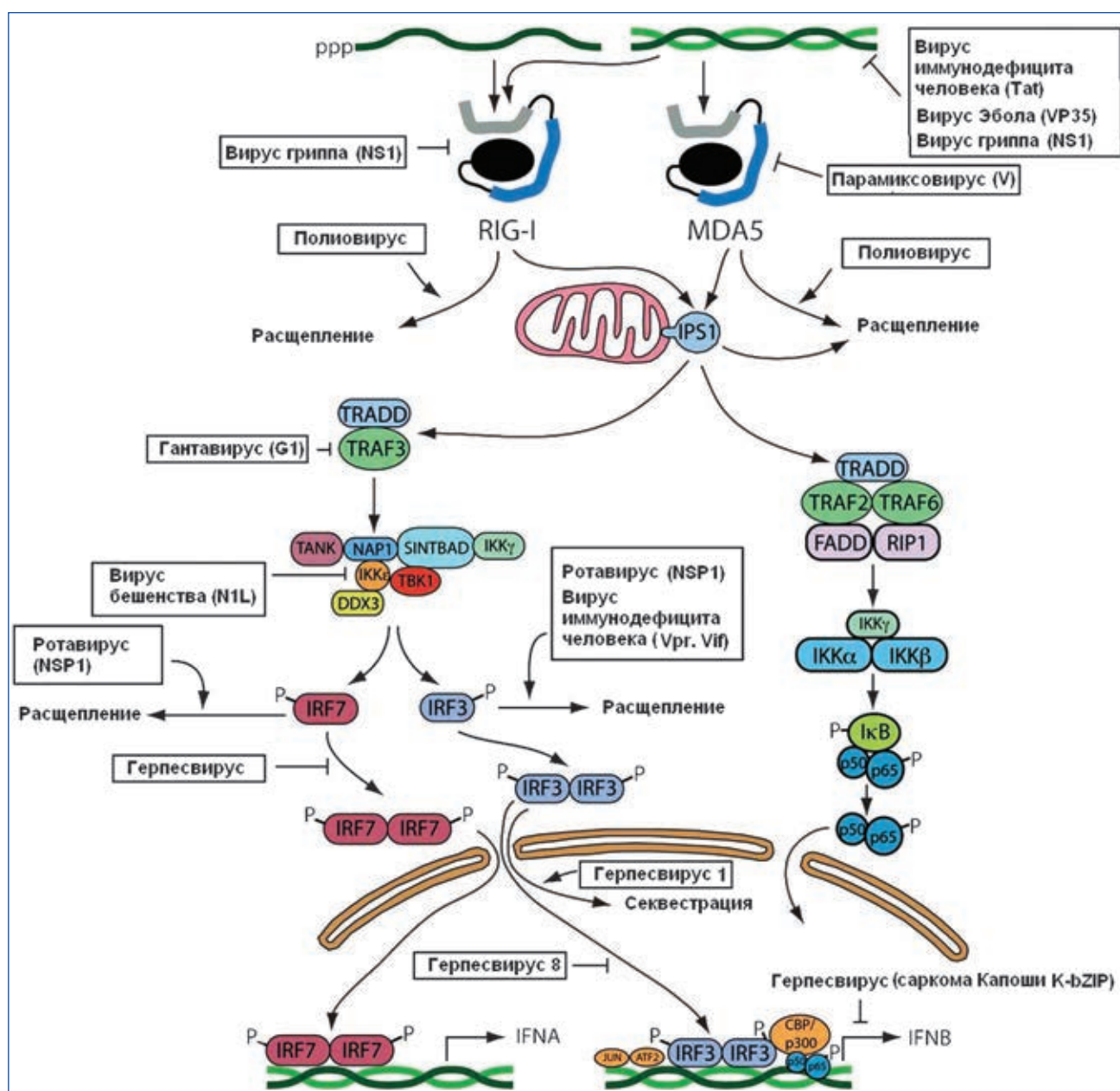


Рисунок 8. Ингибирующее действие вирусов на RLR-ассоциированные пути возбуждения [27]  
Примечание: в скобках указан непосредственный эффекторный белок.



продукцію IFN, а низка експресія LGP2 способує інтерферогенезу [37, 77].

Другі молекулярні механізми подавлення IFN-продукції: конкуренція і секвестрація RLR, секвестрація киназ, протеасомна деградація RLR і IPS-1, деубіквітинірування сигнальних молекул і целевих протеїнів представлені в табл. 1.

Наличчя такого різноманітності негативних зворотних зв'язей точно регулює рівень активності механізмів протівовірусної захисти, попереджаючи розвиток як аутоімунного процесу, так і хронічного течення запалення (рис. 7).

Paola M. Bagral і соавт. [27] представили всеохоплюючий огляд, в якому показали, що віруси, набуваючи в процесі еволюції можливість синтезу особливих генних продуктів, які інгібують практично кожен крок RLR-асоційованого сигнального шляху, подавляють сенсінг PAMP, трансдукцію сигналу і активацію факторів транскрипції IRF (рис. 8).

В частині, взаємодія продукту RIG-1 і оцПНК фізично блокується неструктурним протеїном 1 вірусу гриппу (NS1), який в інфікованій клітині утворює з протеїном RIG-1 єдиний комплекс. А протеїн V параміксовірусів інгібує функціонування MDA-5 [3, 77]. ЗСрго протеїназа пікорнавірусів, протеаза NS3/4A вірусу гепатиту С обумовлюють деградацію IPS-1 [20]. Протеїн V параміксовірусів здатний зв'язуватися з ТВК1-ІКке і конкурувати з фактором транскрипції IRF3, таким чином попереджаючи його фосфорилування.

## Заключення

RLR грають критичну роль в індукції синтезу IFN і запалення в процесі розвитку вірусної інфекції. В зв'язі з цим RLR-таргетна терапія може бути новим і перспективним напрямком в лікуванні вірусних інфекцій.

*Список літератури знаходиться в редакції  
Получено 18.08.13 □*

Абатуров О.Є.<sup>1</sup>, Волосовець О.П.<sup>2</sup>, Юліш Є.І.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України»

<sup>2</sup>Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ

<sup>3</sup>Донецький національний медичний університет ім. М. Горького

### РОЛЬ RIG-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ У РЕКОГНІЦІЇ ПАТОГЕН-АСОЦІЙОВАНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ СТРУКТУР ІНФЕКЦІЙНИХ ПАТОГЕННИХ АГЕНТІВ І РОЗВИТКУ ЗАПАЛЕННЯ. ЧАСТИНА 2. ЛІГАНДИ RLR І ВНУТРІШНЬОКЛІТИННІ СИГНАЛЬНІ ШЛЯХИ, АСОЦІЙОВАНІ З RLR

**Резюме.** В огляді охарактеризовано механізми участі протеїнів RIG-подібних рецепторів в регуляції процесу запалення й імунної відповіді.

**Ключові слова:** запалення, інфекційний процес, RIG-подібні рецептори.

Abaturov A.E.<sup>1</sup>, Volosovets A.P.<sup>2</sup>, Yulish E.I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>State Institution «Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Public Health of Ukraine»

<sup>2</sup>National Medical University named after A.A. Bogomolets, Kyiv

<sup>3</sup>Donetsk National Medical University named after M. Gorky, Donetsk, Ukraine

### THE ROLE OF RIG-LIKE RECEPTORS IN RECOGNITION OF PATHOGEN-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS OF INFECTIOUS PATHOGENS AND IN DEVELOPMENT OF INFLAMMATION. PART 2. RLR LIGANDS AND INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAYS ASSOCIATED WITH RLR

**Summary.** The review described the mechanisms of participation of proteins of RIG-like receptors in the regulation of inflammation and immune response.

**Key words:** inflammation, infection process, RIG-like receptors.