

Activation of Innate Immune System During Viral Infection: Role of Pattern-recognition Receptors (PRRs) in Viral Infection

Eun Jung Jun¹ and Yoo Kyum Kim^{1,2*}

¹Departments of Microbiology, ²Research Institute for Biomacromolecules,
University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Innate immunity and adaptive immunity are two major immune responses against pathogens. Innate immunity is responsible for the immediate immune response to pathogens. Pattern-recognition receptors (PRRs) play an important role in innate immune response. PRRs recognize regular patterns of molecule structure known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Among the PRRs, Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors (RLRs), and DNA-dependent activator of interferon regulatory factors (DAI) display key roles in response to viral infections. This article reviews how viral infections activate PRR-PAMP signal pathways and how viruses evade immune responses elicited by PRR signal pathways.

Key Words: Innate immunity, Viral infection, Toll-like receptor, RIG-I-like receptor, PAMP

인체가 병원체에 감염되면 이를 어떻게 감지하여 면역 반응을 유도하는지를 규명하는 것은 면역학 연구의 중요한 과제이다. 통상적으로 인체의 면역체계는 선천면역계 (innate immunity)와 적응면역계 (adaptive immunity)로 구분하여 설명하고 있지만, 두 면역체계는 서로 상호 보완 기능을 가지고 있어 각각을 명확하게 구분하기는 어렵다. 두 면역체계의 근본적인 차이점은 선천면역계는 숙주의 배선 단계 (germ line)에서 암호화된 수용체 (germline-encoded receptor)를, 적응면역계는 유전자 재조합 과정을 거친 수용체 (somatically generated receptor)를 이용하여 병원체를 인지한다는 것이다. 또한 선천면역계는 비특이적으로, 적응면역계는 특이적으로 병원체에 반응하는 특징을 가지고 있다. Janeway는 인체의 선천면역계에는 pattern-recognition receptors (PRRs)가 존재하며, 이 PRRs는 숙주에는 존재하지 않지만 병원체에 공통적으로 존재하는 특정한 패턴 (pathogen-associated molecule pattern,

PAMP)을 인지한다는 유명한 가설을 1989년 발표하였다 (1). 이후 이 가설을 입증하기 위한 연구가 활발히 진행된 결과, Toll-like receptor (TLR), NALPs, Dectins, retinoic acid-inducible gene I (RIG-I), melanoma differentiation-associated antigen 5 (MDA5), DNA-dependent activator of interferon regulatory factors (DAI) 등이 병원체에 대한 PRR로 작용함을 발견하게 되었다 (2~9). 이 중에서 TLR와 RIG-I, MDA5 및 DAI가 바이러스 인식에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (10). TLR은 transmembrane receptor이고, RIG-I, MDA5 및 DAI는 cytoplasmic receptor이다. 각각의 PRR은 서로 다른 병원체의 특정 패턴을 인식하여 선천면역반응을 일으킨다.

박테리아의 경우에는 세포벽의 구성물질인 lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan (PG), lipoteichoic acid 또는 lipoprotein이 PAMP로 작용하여 숙주의 PRR에 의해 감지되는 것으로 알려져 있고, 진균의 경우에도 세포벽 구성물질인 beta-glucan이 PAMP로 작용하는 것으로 밝혀졌다 (11~19). 즉 박테리아 PAMP는 인체 숙주세포와는 전혀 다른 물질을 함유하고 있어 인체의 선천면역계는 이를 쉽게 non-self로 인식하게 된다. 이에 반해 바이러스의 경우에는 바이러스 입자를 이루는 구성물질 대부분이 숙

Received: July 13, 2009/ Revised: July 23, 2009

Accepted: August 11, 2009

*Corresponding author: Yoo Kyum Kim, M.D. Department of Microbiology, University of Ulsan College of Medicine, 388-1 Pungnap-dong, Songpa-ku, Seoul 138-736, Korea.
Phone: +82-2-3010-4282, Fax: +82-2-3010-4259,
e-mail: ykkim@amc.seoul.kr

주세포에서 기인하므로 인체가 non-self로 인지하기가 쉽지 않다. 그러나 바이러스의 유전자를 구성하는 핵산, 예를 들어 바이러스 RNA는 인체 숙주세포의 RNA와 다른 구조를 가지고 있으므로 숙주세포의 PRR이 이를 감지하여 바이러스의 침입을 인식하면서 선천면역반응이 유도된다.

PRR가 PAMP를 인식하면 일련의 세포내 신호전달경로를 활성화하여 전사인자 (IRF, NF- κ B)를 활성화한다. 활성화된 전사인자는 핵내로 이동하여 interferon (IFN) 생성을 증가시킨다. 분비된 IFN는 autocrine 또는 paracrine 방식으로 type I IFN 수용체와 결합하여 IFN-stimulated response elements (STAT1, STAT2, IRF9의 복합체)를 활성화시켜 핵내로 이동을 유발하여 IFN-inducible genes의 전사를 유도한다 (8, 9, 20~22).

또한 PRR가 PAMP를 인식하면 수지상세포 (dendritic cell, DC)의 성숙과 B/T 림프구 활성화가 이루어진다. 즉 주조직적합복합체 (major histocompatibility complex, MHC) 발현이 증가하여 T 림프구가 항원을 쉽게 인식하게 하며, T cell clonal expansion에 중요한 co-stimulatory molecule가 upregulation되어 면역조절 사이토카인 분비를 촉진하여 T 림프구가 작동세포 (effector cell)로 분화하게 한다. 또한 TLR 신호는 큰포식세포 (macrophage)와 DC가 IL-12를 분비하게 하며, 이는 T 림프구를 Th1 림프구로 분화하게 한다. Th1 림프구는 IFN- γ 를 분비하며, 이는 다시 큰포식세포를 활성화하게 된다 (23).

Toll-like receptor (TLR)의 바이러스 인식

Toll receptor는 초파리인 *Drosophila melanogaster*의 발생 과정에서 전후방축 형성에 관여하는 수용체로 처음 발견되었다 (24). 이후 Toll receptor는 Hofmann 등에 의해 초파리의 분화 작용뿐 아니라 진균 감염에 대한 면역기능에 중요한 기능을 하는 것으로 밝혀졌다 (25). Toll이라는 단어는 "이상한 (weird)"의 의미를 가진 독일어에 기인하는데 이 유전자의 이상 시 초파리의 발생이 기괴하게 이루어진다는 것에서 그 이름이 기원한다.

이후 사람을 비롯한 포유류에도 이와 유사한 수용체가 선천면역기능에 관여할 가능성에 대한 연구가 시작되었다. Janeway 그룹의 Medzhitov가 1997년 드디어 인체에도 Toll receptor와 상동성을 지닌 수용체가 존재한다는 사실을 밝혀내었고, 이를 Toll-like receptor (TLR)라 명명

하였다. 또한 TLR은 NF- κ B 신호전달경로를 활성화하여 면역반응에 관여한다는 사실을 클로닝된 TLR 유전자와 TLR에 대한 항체를 사용하여 입증하였다 (26). 이들은 또한 TLR은 transmembrane protein으로 leucine-rich repeat를 함유하는 extracellular domain, 짧은 transmembrane domain, IL-1 receptor의 cytoplasmic domain과 유사한 cytoplasmic domain으로 구성되어 있음을 밝혀냈다. 이후 마우스를 이용한 연구가 진행됨에 따라 TLR은 여러 종류가 존재하며, 바이러스뿐 아니라 박테리아, 진균 및 원생동물을 감지하여 선천면역반응을 일으킨다는 사실이 밝혀졌으며, Rock 등에 의해 TLR1, 2, 3, 4 및 5가 클로닝된 (27) 이후로 현재까지 사람에게는 10종, 마우스에는 13종의 TLR이 발견되었다. 비록 모든 TLR은 유사한 leucine-rich repeat를 extracellular domain으로 가지고 있으나, 각각의 TLR은 다른 PAMP를 인식한다 (Fig. 1). 예를 들어 TLR3는 바이러스의 dsRNA를, TLR4는 박테리아의 LPS를, TLR5는 박테리아의 flagella를, TLR7/8은 ssRNA를, TLR9은 dsDNA를 인식한다 (28, 29). 이중 바이러스의 핵산을 인식하는 TLR는 TLR3, TLR7, TLR8, TLR9이다 (2, 30). 이외에 TLR2와 TLR4가 바이러스의 단백질 등을 인식하여 선천면역반응을 일으킨다.

지금까지 많은 종류의 TLR이 발견되었고, 각각의 리간드 (ligand)가 속속 밝혀졌지만 TLR이 어떻게 리간드와 반응하여 신호전달경로가 활성화되는지에 대한 연구는 최근에야 이루어졌다. Kim 등은 TLR4가 MD2와 heterodimer를 이루어 LPS와 결합한다는 사실을 LPS의 analog인 Eritoran을 이용한 crystal structure 연구를 통해 밝혀냈다 (31). 또한 같은 연구실의 Jin 등은 lipopeptide가 TLR1와 TLR2의 "m" 형태의 heterodimer 결합을 유도한다는 사실을 밝혔다 (32). 하지만 TLR이 병원체의 특정 패턴을 어떻게 인지하는지에 대한 연구는 더 이루어져야 할 것이다.

TLR3의 dsRNA 인식

TLR3는 conventional dendritic cell (cDC)의 경우에는 세포내 vesicle에 존재하나, 섬유모세포 (fibroblast)의 경우에는 세포 표면에 존재한다 (33). Alexopoulou 등은 TLR3^{-/-} 마우스를 사용하여 TLR3는 synthetic RNA analog [polyinosinic acid-cytidylic acid, poly(I:C)]뿐 아니라 바이러스 dsRNA를 인식하여 전사인자 NF- κ B를 활성화시켜 type I IFN 생성을 유도한다는 것을 입증하였다 (34). 따

라서 이들은 TLR3^{-/-} 마우스에서 분리된 큰포식세포는 poly(I:C)에 의해 생성되는 type I IFN, IL-6 및 IL-12가 야생형 마우스에 비해 현저히 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 단순히 TLR3^{-/-} 마우스에 바이러스를 접종하면 기대되는 면역기능 장애 현상을 관찰할 수 없었다 (35). 이러한 예상과는 다른 결과는 cytosolic viral RNA receptor인 RIG-I와 MDA5가 발견됨으로 해결되었다. 즉 RNA 바이러스에 감염된 TLR3^{-/-} 마우스의 세포는 TLR3에 의해 유도되는 신호전달경로는 파괴되었지만 cytosolic RNA 수용체에 의해 유도되는 신호전달경로가 손상되어 있지 않으므로 면역기능 장애 현상을 관찰할 수 없었다고 추정된다. 또한 dsRNA 바이러스가 아니라 ssRNA 바이러스인 encephalomyocarditis virus (EMCV)가 TLR3 신호전달경로에 의해 면역기능이 활성화된다는 사실은 TLR3가 RNA 바이러스 증식 중에 생기는 중간산물인 dsRNA를 인식한다는 것을 의미한다. 그러나 아직까지 dsRNA의 어떤 특성 때문에 TLR3가 활성화되는지를 이해하기 위해서는 많은 연구가 필요하다.

TLR7/8에 의한 ssRNA 인식

TLR7과 TLR8은 매우 유사한 구조와 작용을 하는 것으로 추측되고 있으나, TLR8^{-/-} 마우스는 개발되지 않고 있어서 TLR7/8 연구는 TLR7^{-/-} 마우스를 사용하여 이루어지고 있다. TLR7^{-/-} 마우스의 pDC를 이용한 실험을 통하여 TLR7은 ssRNA 바이러스 (예: influenza virus, VSV, HIV)를 인식한다는 사실이 입증되었다 (36, 37). Chloroquine을 사용한 실험을 통하여 endosome 내에서 TLR7과 ssRNA가 반응한다는 사실이 입증되었다. 또한 MyD88^{-/-} 마우스를 사용하여 MyD88이 TLR7 신호전달경로에 adaptor protein 역할을 한다는 사실이 증명되었다. 또한 Heil 등은 ssRNA가 마우스뿐만 아니라 사람 TLR8의 리간드로 작용함을 입증하였다 (38). 하지만 바이러스 RNA 뿐 아니라 self-RNA를 endosome에 삽입하여도 TLR7 신호전달경로가 활성화된다는 사실은 ssRNA의 localization이 TLR7 신호전달경로의 중요한 요소일 것으로 추측하게 한다. 구체적으로 ssRNA가 어떻게 TLR7/8과 반응하여 신호전달경로를 활성화시키는가에 대해서는 연구가 더 필요하다.

TLR9에 의한 dsDNA 인식

Krieg 등은 박테리아 DNA의 특징인 unmethylated CpG

dinucleotides가 면역자극제로 작용한다는 사실을 1995년 입증하였다 (39). 마우스를 이용한 *in vivo* 실험에서, 야생형 마우스와 다르게 TLR9^{-/-} 마우스는 CpG DNA 자극에도 불구하고 splenocyte의 증식과 B 림프구에서의 MHC II 발현 증가를 관찰할 수 없었다. 또한 TLR9^{-/-} 마우스의 큰포식세포는 CpG DNA 자극에도 TNF- α , IL-6, IL-12 생성이 저해됨을 관찰할 수 있었으며, DC 역시 CpG DNA 자극에도 CD40, CD80, CD86 및 MHC 등의 유전자 발현이 증가되지 않았다. 이러한 결과는 TLR9^{-/-} 마우스는 CpG DNA 자극에 의해 면역반응이 유도되지 않으며, 이는 TLR9이 CpG DNA에 의해 유도되는 면역기전에 중요한 역할을 함을 의미한다 (40~42). 박테리아 DNA와 포유류 DNA와의 차이점은, 1) 박테리아 DNA는 CpG dinucleotide가 포유류 DNA에 비해 상대적으로 많고, 2) unmethylated CpG dinucleotide가 박테리아 DNA에 상대적으로 많다는 것이다. 이러한 차이점들에 의해 TLR9는 self DNA와 non-self DNA를 구분하는 것으로 추측된다. 또한 TLR9 신호전달경로는 MyD88을 adaptor protein으로 사용한다는 사실이 밝혀졌다 (43, 44). 이후 HSV-1 (45, 46)과 HSV-2 (46)의 DNA는 TLR9를 통하여 type I IFN 생성을 유도한다는 사실이 입증되었다. 즉 HSV-1의 경우, IFN-producing cell (IPC)은 TLR9에서 MyD88로 이어지는 신호전달경로에 의해 type I IFN과 IL-12를 생성한다. 그러나 MyD88^{-/-} 마우스와 다르게 TLR9^{-/-} 마우스는 HSV-1 감염에 야생형과 유사하게 반응한다는 사실은 TLR9에서 MyD88로 이어지는 신호전달경로 외에 다른 MyD88 신호전달경로가 존재할 가능성을 의미한다. HSV-2 경우 pDC는 TLR9에서 MyD88로 이어지는 신호전달경로에 의해 type I IFN이 생성되며, TLR9의 HSV-2 DNA 인식은 endosome-mediated pathway에 의함이 입증되었다. 또한 MyD88^{-/-}나 TLR9^{-/-} 마우스 경우 HSV-2 감염이 야생형 마우스와 다르게 혈청 내에서 IFN- α 의 분비를 감지할 수 없었다. 상술한 두 연구논문은 HSV-1과 HSV-2가 TLR9 신호전달경로에 의해 type I IFN 생성을 유발하는 것을 명확히 입증하였으나, *in vivo*에서 TLR9가 실제로 바이러스 감염에 대한 방어기전에 중요한 역할을 하는지에 대한 사실은 입증하지는 못했다. 그러나 MCMV를 이용한 연구에서 TLR9^{-/-} 마우스는 MCMV의 증식이 증가하고 사망률이 높음을 입증하였다 (47, 48). 즉 *in vivo*에서도 TLR9는 DNA 바이러스 감염에 중요한 역할을 한다는 사실을 미루어 짐작할 수 있다.

TLR 신호전달경로

TLRs가 PAMP와 반응하여 어떻게 type I IFN의 생성을 유도하는가에 대한 세포 내 신호전달경로에 대해서는 현재 가장 활발히 연구되고 있는 분야이다. 따라서 아직까지 정확한 경로가 밝혀지지는 않고 있으나 지금까지의 연구 결과를 정리하면 다음과 같다 (6, 20, 28, 29, 49).

MyD88-mediated signaling pathway

TLR7, TLR8 및 TLR9의 신호전달경로는 MyD88을 adaptor protein으로 사용한다. TLRs에 의해 활성화된 MyD88은 IRAK-1, IRAK-4 및 TRAF-6를 신호물질로 사용한다. 이후 TAK1과 IKK가 순차적으로 활성화되어 NF- κ B를 핵내로 이동시켜 염증성 사이토카인의 생성을 유도하고, 또한 IRF7을 활성화하여 Type I IFN의 생성을 유도한다. 그러나 cDC의 경우에는 아마도 IRF1이 type I IFN 생성에 관여할 것으로 추측된다 (50).

TRIF-mediated signaling pathway

TLR3의 leucine-rich repeat motif인 ectodomain이 dsRNA를 인식한 후, adaptor protein인 TRIF와 반응하여 전사인자인 IRF3와 NF- κ B를 활성화시켜 type I IFN을 생성하게 된다. 즉 TRIF와 반응한 TBK1, IKKi, TRAF3 및 NAK-associated protein (NAP1)은 IRF3를 인산화하여 활성화시킨다. 활성화된 IRF3는 핵 내로 이동하여 IFN-stimulated response elements (ISREs)와 반응하여 type I IFN의 생성을 유도하며, Type I IFN은 IRF7 등 IFN-inducible genes 발현을 유도한다.

RIG-I-like receptor (RLR) and DAI (DLM-1/ZBP1)에 의한 바이러스 인식

바이러스 감염을 인식하는 PRR로 TLR 외에 다른 PRR가 존재할 가능성은 다음과 같은 실험적, 이론적 증거에

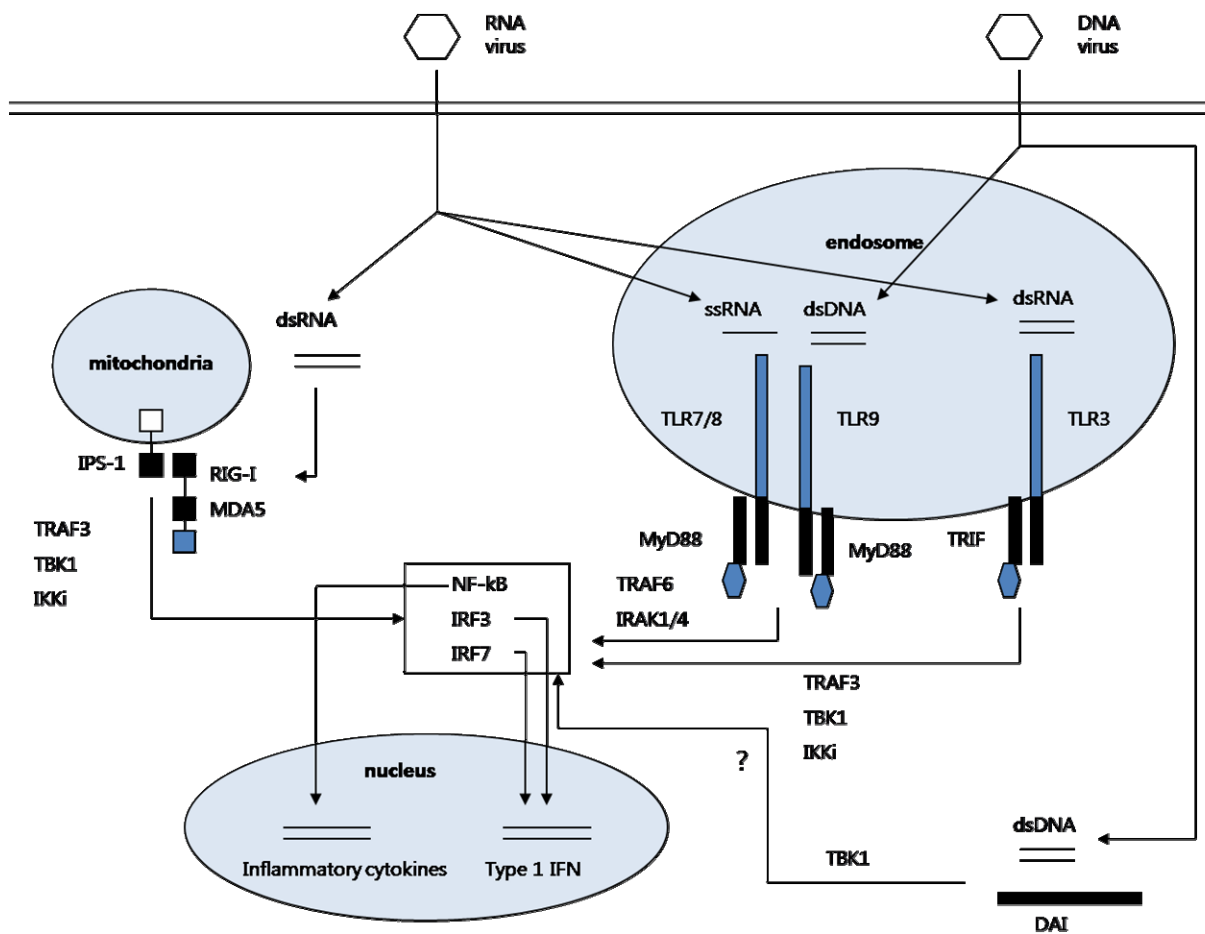


Figure 1. Signaling pathways through PRRs in response to viral infections

기인한다 (51, 52). 1) TLR3^{-/-} 마우스의 섬유모세포와 cDC는 TLR3 결핍에도 불구하고 poly(I:C) 또는 Sendai virus, Newcastle disease virus (NDV) 및 vesicular stomatitis virus (VSV)에 감염이 되면 IFN- β 를 생성한다 (53~55). 2) TLR3는 transmembrane protein이므로 세포질 내에서 증식이 일어나는 RNA 바이러스의 경우 바이러스 중간산물이 TLR3에 노출될 가능성이 낮다. 3) 거의 대부분의 세포는 바이러스에 감염되면 type I IFN을 생성하지만, TLR3를 발현하는 세포의 종류는 주로 면역세포에 국한되어 있다. 이러한 사실들을 바탕으로 RIG-I와 MDA5가 세포질 내에서 증식하는 RNA 바이러스에 대한 PRR로 작용함이 규명되었고 (56, 57), 인체와 마우스에는 RIG-I, MDA5, Laboratory of Genetics and Physiology 2 (LGP2) 등 3 종류의 RLR이 존재한다는 사실이 밝혀졌다 (57). LGP2는 바이러스 RNA가 RIG-I와 MDA5에 의해 인식되는 이전에 negative regulator로 작용한다 (58). 3종류의 RLR은 모두 helicase domain (HD)과 repress domain (RD)이 존재하며 RIG-I와 MDA5는 caspase-recruitment domain (CARD) 또한 존재한다. 세포질 내 RNA는 RIG-I와 MDA5가 인식하는 반면, 세포질 내 DNA는 DAI가 인식한다 (59). RLR과 DAI의 신호전달경로는 Fig. 1과 같다.

Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)

Yoneyama 등은 DExD/H box-containing RNA helicase family에 속하는 RIG-I가 세포 내의 dsRNA를 인식하여 선천면역반응에 중요한 역할을 한다는 사실을 밝혔다 (55). 이들은 RIG-I는 N-terminal 쪽으로 두 개의 CARD와 C-terminal 쪽으로 RNA-HD를 가지고 있다는 사실과, dsRNA가 RNA-HD에 결합하면 ATP-hydrolyzing 기능을 활성화하여 RIG-I의 구조를 변화시켜 CARD가 downstream으로 신호를 전달할 수 있게 하여 type I IFN 생성을 유도한다는 사실을 밝혀내었다. 이들은 또한 자극이 없는 상태에서는 RNA-HD에 의해 RIG-I의 기능이 autorepression 될 가능성이 있음을 증명하였다.

RIG-I는 dsRNA 뿐 아니라 poly(I:C), poly(A:U), hepatitis C virus (HCV)의 5'-과 3'-untranslated region과 결합하지만 dsDNA, poly(A), yeast tRNA와는 결합하지 않는다 (55, 60, 61). 또한 RIG-I는 5' 말단에 triphosphate가 부착된 ssRNA와 결합하여 type I IFN 생성을 초래한다는 사실이 influenza virus를 이용한 실험을 통하여 입증되었다 (62). 그러나 poly(I:C)는 후술할 MDA5가 인식하고, *in*

vitro transcribed dsRNA는 RIG-I가 인식한다는 결과도 있다 (63).

RIG-I^{-/-} 마우스를 이용한 실험에 의하면 섬유모세포와 cDC는 NDV, Sendai virus 및 VSV에 감염이 되면 RIG-I 신호전달경로에 의해 type I IFN 생성이 유도된다. 이에 반해 pDC는 RIG-I 신호전달경로보다는 TLR7과 TLR9 신호전달경로가 type I IFN 생성을 주로 담당하는 것으로 알려져 있다 (64). 이들은 또한 RIG-I가 과발현된 세포의 경우 EMCV 감염에 저항성을 가지는 것을 입증하였다. 이 외에도 현재까지 paramyxoviruses, Japanese encephalitis virus (JEV), West Nile virus, Dengue virus 등 많은 바이러스들을 RIG-I가 인식한다는 것이 보고되고 있다 (Table 1) (65, 66).

Melanoma differentiation-associated antigen 5 (MDA5)

Yoneyama 등은 RIG-I와 유사한 구조를 갖는 RNA helicase로 MDA5와 LGP2가 있음을 발표하였다 (58). 이들은 MDA5를 과발현시킨 세포의 경우 NDV, VSV, EMCV 감염 시 항바이러스 반응을 하며, MDA5^{-/-} 마우스 경우에는 NDV 감염에 type I IFN 생성이 억제됨을 관찰하였다. 이러한 결과는 MDA5가 dsRNA를 인지하여 선천면역반응이 일어난다는 것을 의미한다.

Kato 등은 RIG-I와 MDA5는 구조적으로 유사하지만 서로 다른 바이러스 종류를 인식한다는 결과를 발표하였다 (63). 즉 RIG-I^{-/-} 세포의 경우 Sendai virus, NDV, VSV, influenza A virus 및 JEV 감염에 의한 사이토카인 생성이 저하되고, MDA5^{-/-} 세포의 경우 EMCV, Theiler's virus, Mengo virus 등 picornavirus 감염에 의한 cytokine 생성이 저하된다. 따라서 RIG-I^{-/-} 마우스의 경우에는 JEV 등에, MDA5^{-/-} 마우스는 EMCV 등에 쉽게 감염됨을 *in vivo*로 확인할 수 있었다.

Interferon-beta promoter stimulator 1 (IPS-1)

IPS-1은 mitochondrial outer membrane 단백질로서 IPS-1/MAVS/VISA/Cardif 등 이름을 혼용해서 쓰이고 있으나, GenBank에 의한 공식적인 이름은 *Homo sapiens*의 경우 MAVS, *Macaca mulatta*의 경우 VISA, *Rattus norvegicus*의 경우 VISA이다. RIG-I와 MDA5에 의한 신호전달경로는 IPS-1이 adaptor protein으로 작용하여 (66~70) NF- κ B와 IRF3/7을 활성화시킨다.

IPS-1의 과발현은 IFN- β , IFN- α 4, IFN- α 6나 NF- κ B

Table 1. Recognition of viruses by PRRs

PRR	Pathogen	References
TLR3	EMCV	35
	Semliki Forest Virus	35
	MCMV	86
	Reovirus	34
	West Nile Virus	82, 85
TLR7	Influenza Virus	36, 37
	VSV	37
	Sendai Virus	36, 37
TLR9	MCMV	47, 48
	HSV-1	45
	HSV-2	46
RIG-I	Influenza Virus	65, 66
	Hepatitis A virus	66
	Hepatitis C virus	60
	Japanese Encephalitis Virus	65, 66
	Dengue Virus	65, 66
	New Castle Virus	64
	Sendai Virus	63, 64
	Vesicular Stomatitis Virus	63, 64
	West Nile Virus	65, 66
	Rabies Virus	65, 66
	Respiratory Syncytial Virus	65, 66
	Ebola Virus	65, 66
	Measles Virus	65, 66
MDA5	West Nile Virus	65, 66
	EMCV	63, 64
	Theiler's Virus	63, 64
	Mengo Virus	63, 64
	Paramyxovirus	90
	Picornavirus	65, 66
	Dengue Virus	65, 66

promoter를 활성화시키고 VSV 증식을 억제한다 (67, 71, 72). 또한 IPS-1^{-/-} 시 dsRNA와 VSV 감염에도 IFN 생성이 억제된다. 또한 Meylan 등의 연구 결과에 따르면 hepatitis C virus의 NS3/4A 단백질은 IPS-1의 mitochondrial outer membrane에 위치하는 도메인을 절단하여 IFN 생성을 억제한다 (68). 이러한 증거들은 IPS-1이 RIG-I와

MDA5 신호전달경로에 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 또한 IPS-1 downstream 쪽으로는 TBK1과 IKK이 중요한 역할을 한다 (66).

DNA-dependent activator of interferon regulatory factors (DAI)

세포질 내에서 RNA 바이러스를 RIG-I와 MDA5가 인지하듯이 이와 유사하게 DNA 바이러스에 대한 cytosolic sensor가 존재할 것이라는 사실을 Takao 등이 2007년 증명하였다 (52, 59). 즉 DAI라는 sensor가 dsDNA와 결합하며, DAI를 과발현하면 dsDNA에 의한 IFN 생성이 증가한다는 것을 입증하였다. 또한 siRNA를 이용하여 DAI 유전자 발현을 억제하면 dsDNA를 주입하여도 IRF3, NF- κ B, IFN에 관련된 유전자의 발현이 저하됨을 입증하였다. 그러나 불완전한 siRNA 실험 결과는 DAI 외에 다른 sensor의 존재 가능성을 배제할 수 없다 (73). DAI는 DNA와 결합하는 도메인과 유전자 발현을 조절하는 단백질과 결합하는 단백질 결합 도메인으로 이루어졌다는 사실은 밝혀졌지만, 현재까지 DAI가 DNA를 인식하는 과정과 이에 따른 유전자 발현조절 기전은 알려져 있지 않다 (74).

Self nucleic acid와 viral nucleic acid의 인식

인체의 면역체계가 self와 non-self를 구분하지 못하면 자가면역 질환을 유발할 수 있으므로 인체의 PRR은 self와 non-self를 구분하여 선택적으로 면역반응을 일으킬 수 있어야 할 것이다. 한편 바이러스를 구성하는 성분은 모두 숙주세포에서 기인하므로, 엄격한 기준으로는 바이러스 핵산이 숙주세포에 non-self로 인식될 이유는 없다. 그렇다면 바이러스 핵산은 어떻게 PAMP로 작용할까? 여기에 대한 연구가 현재 활발하게 진행되고 있어 수년 내에 정확한 기전이 밝혀질 것으로 기대된다. 본 종설에서는 지금까지의 연구 결과를 바탕으로 숙주세포가 어떻게 바이러스 핵산을 PAMP로 인식하여 선천면역반응을 일으키는지에 대해 설명하고자 한다.

구조적인 차이

특정 ssRNA 바이러스 (Sendai virus 등)는 게놈의 증식 시 시발체 (primer)로 세포 내의 5' triphosphate nucleotides를 이용한다. 따라서 이러한 바이러스의 ssRNA는 5' 말단에 triphosphate가 부착되어 있다. 이에 반해 숙주의

mRNA는 5' 말단이 methylguanosine capping 되어 있고, tRNA는 5' 말단에 monophosphate가 부착되어 있다. rRNA의 경우에는 바이러스와 마찬가지로 5' 말단에 triphosphate가 부착되어 있지만 ribosomal 단백질이 결합되어 있어 (75) RIG-I가 인식하지 못하는 것으로 추측된다. 즉 5' 말단에 triphosphate가 부착된 바이러스 RNA를 숙주세포의 PRR이 non-self로 인식하여 type I IFN을 생성하게 된다 (76). 특히 RIG-I의 RD 도메인이 5'의 triphosphate를 인식하게 되는데, 이 경우 RIG-I는 비활성 상태에서 활성 형태가 되어 신호전달경로가 활성화된다 (58, 77~79). 하지만 일부 ssRNA 바이러스 (EMCV, picornavirus 등)의 경우 시발체로 단백질 (VPg)을 사용하는 경우가 있어 이런 경우는 RIG-I에 의해 인식되지 않게 된다. 이런 경우 MDA5의 역할이 중요할 것으로 예상되나, 그 인식과정은 정확히 밝혀져 있지 않다.

정상적인 숙주세포에서는 dsRNA가 존재하지 않지만, 바이러스, 특히 RNA 바이러스에 감염이 되면 바이러스의 증식과정에 생성되는 중간산물인 dsRNA가 세포 내에 다량으로 존재하게 되고 이를 PRR이 인식하여 선천면역 반응이 일어나게 된다. 또한 최근 연구 결과에 의하면 바이러스에 감염된 세포는 RNase L이 활성화되어 세포의 RNA를 분해하여 small self RNA가 증가하고, 이것이 RIG-I 및 MDA5 신호전달경로를 활성화하여 type I IFN 생성을 촉발한다고 한다 (80). 즉 self RNA도 PRR 신호전달경로를 활성화할 수 있다는 것이다. 이것은 다음에 설명할 localization의 차이로 설명할 수 있을 것이다.

Localization

바이러스 핵산, 특히 DNA의 경우에는 단순히 숙주세포 DNA와 바이러스 DNA의 차이로 설명할 수 없다. 즉 두 DNA는 구조적으로 차이가 없다고 할 수 있다. 그렇다면 숙주세포는 바이러스 DNA를 어떻게 인식하나? 가장 가능성 높은 설명은 정상적인 숙주세포는 DNA가 핵 내에 존재하므로 cytosolic PRR이나 endosomal PRR에 숙주 DNA가 노출되지 않지만, 바이러스 감염 시 바이러스 DNA는 cytosol이나 endocytosis 등에 의해 endosome에 존재하게 되므로 숙주세포의 PRR에 의해 인식되어 선천성 면역반응을 일으키게 된다 (81, 82). 하지만 많은 실험실에서 plasmid DNA를 대량으로 transfection하여도 IFN 유전자가 강하게 발현되지 않는다는 것이 경험적으로 알려져 있어, 단순한 localization에 의한 구분 이외에 다른 기

전이 존재할 가능성을 배제할 수 없다. Self RNA의 경우에도 endosome에 존재할 때에는 신호전달경로를 활성화하는 것으로 추측된다.

바이러스 감염에서 PRR 신호전달경로의 중요성

지금까지의 *in vitro* 결과를 바탕으로 유추하면 TLR^{-/-} 마우스의 경우 여러 바이러스에 대해 감수성이 증가하여 사망률이 증가해야 한다. 그러나 마우스를 이용한 *in vivo* 실험은 다음과 같이 혼란스러운 결과를 보인다.

VSV, LCMV, reovirus 감염에 의한 사망률이 TLR^{-/-} 마우스와 야생형 마우스에서 큰 차이가 없었고 (35, 83), 오히려 TLR^{-/-} 마우스에서 Punta Toro virus 감염에 저항성을 보였다 (84). 더구나 TLR3^{-/-} 마우스는 West Nile virus 감염에 저항성을 가지며, 오히려 야생형 마우스는 TLR3가 blood brain barrier에 손상을 주어 뇌의 염증반응을 유도하여 TLR3^{-/-} 마우스보다 사망률이 높았다 (85). 한편 TLR9^{-/-} 마우스의 경우에는 MCMV와 HSV-2 감염 시 야생형 마우스에 비해 감수성이 높아져 사망률이 높았고 (45, 46, 48, 86), HSV-1 감염 시에는 저항성을 갖는 것으로 확인되었다 (45).

상술한 *in vivo* 결과는 매우 혼란스러워 TLRs이 *in vivo* 방어기전에 얼마나 기여하는가에 대해 어떠한 결정적인 결론도 맺기 어렵다. 최근 Zhang 등은 (87) 사람의 경우 TLR3의 이상 시 실제로 herpes simplex encephalitis (HSE)에 대한 감수성이 증가된다는 증거를 제시하였다. 그들은 두 명의 HSE 환자에서 TLR3의 extracellular domain에 위치한 554번째 아미노산이 proline에서 serine으로 치환된 (P554S) TLR3 변이를 발견하였다. 이 변이는 dominant negative로 작용하여 TLR3 리간드인 poly(I:C)에 반응하지 않아 type I IFN 생성이 저해된다는 사실을 발견하였다. 결론적으로 저자들은 TLR3는 HSE 질환 발생에 중요한 역할을 할 것으로 유추하였다. 또한 Bochud 등은 HSV-2에 의한 생식기 질환의 정도와 감염 부위에서의 바이러스 방출 정도는 환자의 TLR2의 유전자 차이에 의해 결정된다는 사실을 보고하였다 (88). 이 논문들은 지금까지의 *in vivo*에서의 TLR의 역할에 회의적인 시각을 바꿀 수 있는 획기적인 것이었다.

한편 RIG-I^{-/-} 마우스는 JEV에, MDA5^{-/-} 마우스는 EMCV에 감수성이 높은 것으로 추측된다 (63). 하지만 TLR, RIG-I, MDA5, DAI의 이상이 인체의 선천성 면역

Table 2. Anti-immune strategies of viruses

Pathogen	Pathogen component	Target site	Effect	References
Paramyxovirus (Simian Virus 5)	V	MDA5	Bind to MDA5 and inhibit its activation of the IFN- β promoter	93
HCV	NS3/4A	IPS-1	Cleave IPS-1 from mitochondria	68, 95, 96
Vaccinia Virus	A46R	MyD88 & TRIF	A46R contains a TIR domain and target the MyD88/TRIF	94
Influenza Virus	NS1	RIG-I	Inhibit RIG-I binding to ssRNA	92
Hepatitis A Virus	3ABC	RIG-I	Cleave IPS-1	97, 98
Adenovirus	Sequence motif		Clustering of CpG motif	99

체계의 이상, 나아가 인체질환에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 보다 많은 임상과 연관된 연구가 필요하다.

PAMP-PRR에 의해 유도되는 면역반응에 대한 바이러스의 회피기전

바이러스, 특히 RNA 바이러스의 경우 끊임없이 변이가 생기므로 숙주의 면역방어기전 역시 끊임없이 진화하고 있다. 그런 의미에서 특정한 항체에만 반응하는 후천성 면역반응에 비해 비특이적으로 광범위한 분자에 반응할 수 있는 PRR을 이용한 선천성 면역반응은 방어기전 측면에서 보다 유용하다고 말할 수 있다. 그러나 숙주의 PRR (TLR, RNA helicase) 신호전달경로에 의해 유도된 면역반응을 회피하기 위한 방어기전을 일부 바이러스는 가지고 있다 (Table 2) (49, 58, 89~91).

PRR 신호전달경로와 연관된 숙주 면역체계에 대한 바이러스의 방어기전은 1) 바이러스의 RNA 또는 DNA가 PRR에 결합하는 과정을 방해하거나, 2) 신호전달경로의 downstream을 방해하는 기전을 추론할 수 있을 것이다. 예를 들어 influenza virus의 non-structural 1 (NS1) 단백질은 RIG-I와 결합하여 RIG-I의 신호전달경로를 방해하며 (62, 92), paramyxovirus family에 속하는 simian virus 5의 V 단백질은 MDA5와 결합하여 MDA5에 의해 유도되는 type I IFN 생성을 저해한다 (93). 또한 vaccinia virus의 A46R 단백질은 TIR domain을 가지고 있어 MyD88과 TLR이 반응하는 것을 저해하여 신호전달경로를 방해한다 (94). 이에 반해 HCV의 NS3/4A protease는 adaptor protein인 IPS-1을 절단하여 mitochondria로부터 분리시켜 RIG-I 신호전달경로를 방해한다. 그 결과 type I IFN 생성

이 저해되어 세포의 바이러스에 대한 저항력이 감소하게 된다 (68, 95, 96). Hepatitis A virus 역시 IPS-1을 절단하여 type I IFN 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다 (97, 98). 한편 adenovirus의 경우에는 CpG motif의 차이에 의해 면역반응이 다르게 나타난다 (99). 예를 들면, CpG가 random하게 분포된 type 12 adenovirus는 면역반응을 일으키나 CpG 분포가 다른 type 2와 type 5 adenovirus는 면역반응을 유도하지 않는다. 즉 DNA 염기서열 차이에 의해 바이러스는 숙주의 방어기전을 회피할 수도 있다.

바이러스 감염에서 선천면역계와 적응면역계의 연관 관계

선천면역반응과 적응면역반응은 서로 협력하여 바이러스 감염에 대해 저항한다. 선천면역체계는 바이러스 감염 즉시 반응하는 숙주의 일차 방어기전이며, 적응면역반응은 감염 수일 또는 수주 후에 반응하는 방어기전이다. 따라서 선천면역반응이 적응면역반응에 어떠한 형태로든 관여한다는 것은 당연한 것처럼 보인다. 예를 들어 T 림프구와 B 림프구가 분화하여 특정한 항체에 반응하기 위해서는 선천면역체계에서 활성화된 antigen presenting cell (APC)에 의해 항원이 전달되어야 한다. 이와 반대로 적응면역반응이 선천면역반응을 조절하는 기능 또한 존재한다. 예를 들어 활성화된 T 림프구와 B 림프구는 역으로 선천면역반응을 활성화하게 된다. 즉 Th1은 큰포식 세포를 활성화하고, Th2는 eosinophile을 활성화하며, B 림프구에 의해 만들어진 항체는 complement pathway, phagocytosis 및 mast cell degranulation에 관여하게 된다 (100). 실제로 IFN- α 의 증폭에 있어 중요한 분자인 IRF7^{-/-} 마우스를 사용한 실험 결과를 보면, 이 경우 IFN- α 의 분비능 저하와 더불어 적응면역체계 역시 저하된다. 또한

최근 연구 결과에 의하면 적응면역반응은 선천면역반응에 의해 유도되는 과민반응을 통제한다는 사실이 밝혀졌다 (101). 즉 이들은 선천면역반응이 과도하게 반응하여 cytokine storm을 초래하여 숙주에 손상을 주는 경우 이를 통제하기 위해 후천성 면역반응에 의해 활성화된 T 림프구가 관여한다는 것을 입증하였다 (23).

결론

바이러스 감염 시 이를 초기에 인지하는 데에 관여하는 PRR로는 transmembrane receptor인 TLR과 cytoplasmic receptor인 RIG-I, MDA5, DAI 등이 있다. TLR-PAMP 신호전달은 MyD88-mediated signaling pathway 또는 TRIF-mediated signaling pathway에 의해 이루어지며, 그 결과 type I IFN의 생성을 통하여 IFN-inducible genes 발현을 유도한다. RIG-I와 MDA5에 의한 신호전달경로는 IPS-1이 adaptor 단백질로 작용하여 NF- κ B와 IRF3/7을 활성화시킨다. 이러한 인체의 면역방어기전에 대항하여 바이러스는 변이를 통해 숙주의 PRR 신호전달경로에 의해 유도된 면역반응을 회피하게 된다. 따라서 PRR의 작용기전 연구는 바이러스 감염에 대한 인체의 면역반응의 이해와 이를 제어할 수 있는 기술 개발에 기초자료를 제공할 수 있을 것이다.

참고문헌

- 1) Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1989;54 Pt 1:1-13.
- 2) Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 2004;4:499-511.
- 3) Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol 2001;2:675-80.
- 4) Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. Nat Rev Immunol 2006;6:33-43.
- 5) Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature 2006;442:39-44.
- 6) Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol 2003;21:335-76.
- 7) Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. Immunol Rev 2009;227:75-86.
- 8) Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. Annu Rev Biochem 2007;76:447-80.
- 9) Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. Mol Cells 2007;23:1-10.
- 10) Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. Nat Immunol 2006;7:131-7.
- 11) Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. Science 1999;285:736-9.
- 12) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science 1999;285:732-6.
- 13) Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM, Weis JJ. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. J Immunol 1999;163:2382-6.
- 14) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol 1999;162:3749-52.
- 15) Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. J Biol Chem 1999;274:33419-25.
- 16) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science 1998;282:2085-8.
- 17) Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. J Biol Chem 1999;274:17406-9.
- 18) Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide

- macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2000;164:554-7.
- 19) Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999;163:1-5.
 - 20) Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem* 2007;282:15319-23.
 - 21) Katze MG, He Y, Gale M Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:675-87.
 - 22) Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 2008;8:559-68.
 - 23) Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819-26.
 - 24) Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988;52:269-79.
 - 25) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll*/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.
 - 26) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
 - 27) Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:588-93.
 - 28) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
 - 29) Mogensen TH, Paludan SR. Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors. *J Mol Med* 2005;83:180-92.
 - 30) Barton GM. Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin Immunol* 2007;19:33-40.
 - 31) Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, Lee JO. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 2007;130:906-17.
 - 32) Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007;130:1071-82.
 - 33) Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2003;171:3154-62.
 - 34) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-8.
 - 35) Edelmann KH, Richardson-Burns S, Alexopoulou L, Tyler KL, Flavell RA, Oldstone MB. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology* 2004;322:231-8.
 - 36) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529-31.
 - 37) Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5598-603.
 - 38) Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526-9.
 - 39) Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;374:546-9.
 - 40) Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9237-42.
 - 41) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-5.
 - 42) Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-60.
 - 43) Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 2000;192:595-600.
 - 44) Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R.

- Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 2000; 10:1139-42.
- 45) Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004;103:1433-7.
- 46) Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003;198:513-20.
- 47) Delale T, Paquin A, Asselin-Paturel C, Dalod M, Brizard G, Bates EE, Kastner P, Chan S, Akira S, Vicari A, Biron CA, Trinchieri G, Briere F. MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN- α release and initiation of immune responses *in vivo*. *J Immunol* 2005; 175:6723-32.
- 48) Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004;21:107-19.
- 49) Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2008;89:1-47.
- 50) Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, Takayanagi H, Ohba Y, Taniguchi T, Honda K. Evidence for licensing of IFN- γ -induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:15136-41.
- 51) Levy DE, Marie IJ. RIGging an antiviral defense--it's in the CARDs. *Nat Immunol* 2004;5:699-701.
- 52) Takaoka A, Taniguchi T. Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:847-57.
- 53) Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, Yamamoto M, Kaisho T, Sanjo H, Kawai T, Hoshino K, Takeda K, Akira S. The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* 2004;199:1641-50.
- 54) Lopez CB, Moltedo B, Alexopoulou L, Bonifaz L, Flavell RA, Moran TM. TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses. *J Immunol* 2004;173:6882-9.
- 55) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-7.
- 56) Yoneyama M, Fujita T. RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:545-51.
- 57) Yoneyama M, Fujita T. Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* 2007;282:15315-8.
- 58) Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 2005;175:2851-8.
- 59) Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 2007;448:501-5.
- 60) Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 2005;79:2689-99.
- 61) Cheng G, Zhong J, Chung J, Chisari FV. Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:9035-40.
- 62) Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006; 314:997-1001.
- 63) Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441:101-5.
- 64) Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005;23:19-28.

- 65) Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, Garcia-Sastre A, Katze MG, Gale M Jr. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* 2008;82:335-45.
- 66) Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* 2008;20:17-22.
- 67) Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005;6:981-8.
- 68) Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005;437:1167-72.
- 69) Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005;122:669-82.
- 70) Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 2005;19:727-40.
- 71) Kumar H, Kawai T, Kato H, Sato S, Takahashi K, Coban C, Yamamoto M, Uematsu S, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med* 2006;203:1795-803.
- 72) Sun Q, Sun L, Liu HH, Chen X, Seth RB, Forman J, Chen ZJ. The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* 2006;24:633-42.
- 73) Yoneyama M, Fujita T. Cytoplasmic double-stranded DNA sensor. *Nat Immunol* 2007;8:907-8.
- 74) Ha SC, Kim D, Hwang HY, Rich A, Kim YG, Kim KK. The crystal structure of the second Z-DNA binding domain of human DAI (ZBP1) in complex with Z-DNA reveals an unusual binding mode to Z-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:20671-6.
- 75) Ramakrishnan V. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 2002;108:557-72.
- 76) Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006;314:994-7.
- 77) Myong S, Cui S, Cornish PV, Kirchhofer A, Gack MU, Jung JU, Hopfner KP, Ha T. Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science* 2009;323:1070-4.
- 78) Cui S, Eisenacher K, Kirchhofer A, Brzozka K, Lammens A, Lammens K, Fujita T, Conzelmann KK, Krug A, Hopfner KP. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell* 2008;29:169-79.
- 79) Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M Jr. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:582-7.
- 80) Malathi K, Dong B, Gale M Jr., Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 2007;448:816-9.
- 81) Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006;7:49-56.
- 82) Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 2007;25:419-41.
- 83) Johansson C, Wetzel JD, He J, Mikacenic C, Dermody TS, Kelsall BL. Type I interferons produced by hematopoietic cells protect mice against lethal infection by mammalian reovirus. *J Exp Med* 2007;204:1349-58.
- 84) Gowen BB, Hoopes JD, Wong MH, Jung KH, Isakson KC, Alexopoulou L, Flavell RA, Sidwell RW. TLR3 deletion limits mortality and disease severity due to Phlebovirus infection. *J Immunol* 2006;177:6301-7.
- 85) Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 2004;10:1366-73.
- 86) Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3516-21.
- 87) Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, Segal D, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A, Picard C, Chapgier A, Plancoulaine S, Titeux M, Cognet C, von Bernuth H, Ku CL, Casrouge A, Zhang XX, Barreiro L, Leonard J, Hamilton C, Lebon P, Heron B, Vallee L, Quintana-Murci L, Hovnanian A, Rozenberg F, Vivier E, Geissmann F, Tardieu M, Abel L, Casanova JL. TLR3

- deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 2007;317:1522-7.
- 88) Bochud PY, Magaret AS, Koelle DM, Aderem A, Wald A. Polymorphisms in TLR2 are associated with increased viral shedding and lesion rate in patients with genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Infect Dis* 2007;196:505-9.
- 89) Finlay BB, McFadden G. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* 2006;124:767-82.
- 90) Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses. *Immunity* 2007;27:370-83.
- 91) Roy CR, Mocarski ES. Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity. *Nat Immunol* 2007;8:1179-87.
- 92) Diebold SS, Montoya M, Unger H, Alexopoulou L, Roy P, Haswell LE, Al-Shamkhani A, Flavell R, Borrow P, C Reis e Sousa C. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 2003;424:324-8.
- 93) Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17264-9.
- 94) Stack J, Haga IR, Schroder M, Bartlett NW, Maloney G, Reading PC, Fitzgerald KA, Smith GL, Bowie AG. Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* 2005;201:1007-18.
- 95) Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:17717-22.
- 96) Loo YM, Owen DM, Li K, Erickson AK, Johnson CL, Fish PM, Carney DS, Wang T, Ishida H, Yoneyama M, Fujita T, Saito T, Lee WM, Hagedorn CH, Lau DT, Weinman SA, Lemon SM, Gale M Jr. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6001-6.
- 97) Fensterl V, Grotheer D, Berk I, Schlemminger S, Vallbracht A, Dotzauer A. Hepatitis A virus suppresses RIG-I-mediated IRF-3 activation to block induction of beta interferon. *J Virol* 2005;79:10968-77.
- 98) Yang Y, Liang Y, Qu L, Chen Z, Yi M, Li K, Lemon SM. Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:7253-8.
- 99) Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12631-6.
- 100) Palm NW, Medzhitov R. Not so fast: adaptive suppression of innate immunity. *Nat Med* 2007;13:1142-4.
- 101) Kim KD, Zhao J, Auh S, Yang X, Du P, Tang H, Fu YX. Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nat Med* 2007;13:1248-52.