

Paula Cristiane Motta Sales

**Regulação da expressão da proteína cinase PKR na ausência de interferons
(IFNs) e seu papel na resposta celular mediada por agonistas dos receptores
TLR2 e TLR4**

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte – MG

2012

Paula Cristiane Motta Sales

**Regulação da expressão da proteína cinase PKR na ausência de interferons
(IFNs) e seu papel na resposta celular mediada por agonistas dos receptores
TLR2 e TLR4**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Aristóbolo Mendes da Silva

Agências financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas – INCTV

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Belo Horizonte

2012

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de vivenciar mais essa vitória em minha vida e aos amigos da eternidade pelo apoio, pela segurança, força e esperança sempre transmitidas.

Ao meu orientador professor Aristóbolo Mendes da Silva pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelas orientações ao longo desses anos.

À coordenadora do programa de Pós-graduação em Biologia Celular professora Cleida Aparecida de Oliveira e a todos os funcionários e professores deste programa pelo suporte.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Genes Inflamatórios, Brenner e Felipe, pelos auxílios nos experimentos e na manutenção dos materiais e equipamentos do laboratório.

As minhas amigas Thalita, Solange, Kátia e Carolina pelo apoio, pela força e pelos momentos de descontração. Foi muito bom trabalhar com vocês!!!

Aos amigos e colegas do programa de Pós-graduação em Biologia Celular pelo aprendizado compartilhado.

Aos professores Mauro M. Teixeira (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG), Daniele da Glória de Souza (Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG), Cristiano Xavier Lima (Faculdade de Medicina/ UFMG) e Flávio Almeida Amaral (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG) pelos experimentos com animais. Em especial ao Flávio e ao Cristiano pela vontade, força e dedicação na realização dos experimentos e pela amizade

À bióloga Fernanda Trindade e aos técnicos responsáveis pelos camundongos do Biotério do Centro de Pesquisa René Rachou.

Aos animais que doaram suas vidas para os experimentos.

E as agências financiadoras: CNPq; FAPEMIG; INCTV.

Dedico essa vitória aqueles que em todos os momentos estiveram ao meu lado e abraçaram o meu sonho como seus.

Aos meus pais, Angelina Carvalho Motta Sales e Paulo Sales pilares incansáveis do que sou, pelo amor, pela compreensão, pelo apoio e dedicação.

Aos meus irmãos, Luana Motta Sales e Alessandro Augusto Motta Sales, companheiros eternos, pelo amor e apoio.

Aos meus cunhados Leandro Luiz do Espírito Santo e Érica Augusta Pacheco, pelo apoio e carinho.

Amo vocês!!!

Sumário

Abreviaturas	7
Lista de Figuras.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	10
1 - Introdução	13
1.1 - Sistema Imune Inato e Receptores do Tipo Toll (TLRs).....	13
1.2 - Vias de Sinalização Induzidas por ligantes dos TLRs.....	18
1.3 - PKR.....	23
1.3.1 – Regulação gênica de PKR	26
1.3.2 – Ativação de PKR	27
1.4 – Os fatores de transcrição Sp e NF-κB.....	30
1.4.1 – Sp.....	30
1.4.2 - NF-κB.....	32
1.5 - Interferons do tipo I e as infecções bacterianas.....	35
1.6 – Monócitos	37
2 – Justificativa.....	40
3 – Objetivos	42
4. Materiais e Métodos	44
4.1 – Células	44
4.1.1 – Tratamento Celular	46
4.1.2 – Viabilidade Celular	47
4.1.3 – Diferenciação Celular	48
4.2 - Detecção dos níveis de expressão do RNA mensageiro (mRNA)	48
4.2.1 - Extração do RNA total	48
4.2.2 - Obtenção da fita simples de cDNA	50
4.2.3 - Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) – SYBR-Green.....	50
4.3 - Western-blot.....	51
4.3.1 - Obtenção de extratos celulares	51
4.3.2 - Quantificação dos extratos celulares (Bradford, 1976)	52
4.3.3 - Fracionamento eletroforético e transferência	52
4.4 - Transfecção	54

4.4.1 - Em células HEK293T	54
4.4.2 – Em células THP-1	56
4.5 - Ensaio de gene repórter através da determinação da atividade da luciferase	58
4.6 - Análise estatística	59
4.7 - Modelo experimental de sepse polimicrobiana (CLP)	59
5 - Resultados	61
5.1 – O tratamento de promonócitos humanos com agonistas TLR4 e TLR2 resulta em aumento nos níveis de mRNA e protéico de PKR.	61
5.2 – O aumento da expressão de PKR em células THP-1 tratadas com agonistas de TLR2 e TLR4 ocorre na ausência de transcrição e síntese de IFNs do tipo I .	72
5.3 – Fatores de transcrição não ativados por IFNs podem estar implicados com ativação de PKR em células THP-1.	86
5.4 – A fosforilação de STAT1 ocorre em células THP-1 diferenciadas a macrófagos tratadas com LPS	91
5.5 – Camundongos deficientes de PKR sobrevivem à septicemia polimicrobiana	94
6 - Discussão.....	97
7 - Conclusão	108
8 – Referências Bibliográficas.....	109

Abreviaturas

cDNA - DNA complementar

dsRNA - RNA de dupla-fita

eIF2 α - subunidade alfa do fator de iniciação da tradução do mRNA em eucariotos

IFN - Interferon

IL-1R - receptor de interleucina 1

ISRE – elemento de resposta estimulado por IFNs

JNK - cinase N-terminal Jun

LPS - lipopolisacarídeo

LRR - repetições ricas em leucina

MAPKKK - proteína cinase cinase cinase ativada por mitógenos

MiA – Mitramicina A

mRNA - RNA mensageiro

MyD88 - fator de diferenciação mielóide

NF- κ B - fator nuclear- κ B

PAMPs - padrões moleculares associados a patógeno

PKR - proteína cinase dependente de RNA de dupla fita

SFB - soro fetal bovino

ssRNA - RNA de fita simples

TLRs - receptores do tipo Toll

TPCK - Tosila cetona fenilalanil clorometil

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura dos TLRs..	15
Figura 2 - Vias de sinalizações mediadas por TLR2; TLR3; TLR4	21
Figura 3 - (A) Abundância relativa do mRNA de PKR em células THP-1 tratadas com os agonistas dos receptores TLR2 e TLR4. (B) Análise por western-blot dos níveis de PKR em células THP-1 tratadas com agonistas de TLR2 e TLR4.....	63
Figura 4 - Análise densitométrica dos níveis de PKR mostrados no western-blot da figura 5B.....	64
Figura 5 - (A) Abundância relativa do mRNA de PKR em células THP-1 tratadas com agonistas dos receptores TLR2 e TLR4 ao longo do tempo. (B) Análise por western-blot da cinética dos níveis de PKR em células THP-1 tratadas com agonistas de TLR2 e TLR4.....	66
Figura 6 - Análise densitométrica dos níveis de PKR mostrados no western-blot da figura 7B.....	67
Figura 7 – Abundância relativa do mRNA de TNF em células THP-1 tratadas com os agonistas dos receptores TLR2 e TLR4.....	68
Figura 8 - Análise da viabilidade celular das células THP-1 em decorrência do tratamento com agonistas dos receptores TLR2 e TLR4.....	71
Figura 9 – Análise da abundância relativa dos mRNAs de IFN- β e subtipos de IFN- α em células THP-1 estimuladas com LPS e Pam3CSK4.....	74
Figura 10 A – Atividade luciferase dos promotores de E-selectina, PKR e ISG56 em células HEK293T.....	78
Figura 10 B - Atividade luciferase do promotor de PKR em células HEK293T.....	80
Figura 11 – Análise da via de sinalização IFN-JAK-STAT após estimulação das células THP-1 com agonistas dos receptores TLR2 e TLR4.....	80
Figura 12 – Efeito da ativação da via Mal/TIRAP sobre a ativação do promotor de PKR em células HEK293T..	82
Figura 13 – (A) Atividade luciferase dos promotores de E-selectina e de IFN-beta. (B) Análise da fosforilação de STAT1 após estimulação das células THP-1 com poly-IC.....	85
Figura 14 – Efeito da Mitramicina sobre os níveis de PKR em células THP-1 estimuladas com LPS e Pam3CSK4.....	88
Figura 15 – Efeito de TPCK sob a expressão de PKR em células THP-1 tratadas com LPS e Pam3CSK4.	89
Figura 16 – Efeito de Bay 11-7082 sob a expressão de PKR em células THP-1 tratadas com LPS e Pam3CSK4.	90
Figura 17 – Análise por Western Blot da fosforilação de STAT1 em células THP-1 diferenciadas e tratadas com os agonistas TLR2/4.....	93
Figura 18 – Camundongos deficientes de PKR sobrevivem ao CLP.....	96

Resumo

O papel da proteína cinase dependente de RNA de dupla fita (PKR) no estado celular antiviral induzido por interferons (IFNs) é bastante conhecido. O aumento de sua expressão em resposta à estimulação por IFNs pode resultar em sua autofosforilação levando à fosforilação de seu substrato eIF2-alfa. Este evento molecular interfere no início da tradução do mRNA, que por sua vez resulta em inibição da síntese protéica. Estudos recentes sugerem o envolvimento de PKR em infecções bacterianas. No entanto, como PKR é ativada e qual é o seu papel biológico nessas infecções é ainda pouco explorado. Assim, o objetivo central do nosso trabalho foi examinar a regulação da expressão da proteína cinase PKR na via de sinalização disparada por agonistas dos receptores TLR2 e TLR4 em uma linhagem promonocítica humana THP-1. Monócitos THP-1 foram tratados com LPS (agonista de TLR4) ou Pam3CSK4 (agonista de TLR2) em doses crescentes ou em diferentes intervalos de tempo. Ao final desses tratamentos, o RNA total e extratos protéicos foram obtidos para análise da abundância relativa do mRNA de PKR por PCR em tempo real e de seus níveis protéicos por ensaios de western-blot, respectivamente. Os resultados mostram um aumento significativo dos níveis do mRNA e protéicos de PKR. De modo surpreendente, não foi observado qualquer aumento nos níveis dos transcritos de IFN-beta ou dos subtipos de IFN-alfa. Além disso, o tratamento das células THP-1 com LPS ou Pam3CSK4 não resultou na fosforilação de STAT1. Os sobrenadantes das células THP-1 tratadas com LPS ou Pam3CSK4 não acaretaram na ativação dos promotores de PKR ou ISG56 em ensaios de gene repórter conduzidos em células HEK293T. Esses resultados fornecem evidências que em monócitos THP-1 expostos à estimulação com agonistas TLR2 e TLR4 não ocorre a ativação transcricional nem tanto a produção de IFNs do tipo I, e que portanto, a expressão de PKR ocorre na ausência de IFNs. Uma vez que a região promotora de PKR contém outros elementos regulatórios candidatos para sua regulação como NF-IL6, NF- κ B, Sp1 e Sp3, decidimos avaliar o efeito de três inibidores farmacológicos. O pré-tratamento das células THP-1 com TPCK ou com Bay11-7082, inibidores farmacológicos do fator de transcrição NF- κ B, inibiu a expressão de PKR induzida pelos agonistas bacterianos. O mesmo foi observado quando as células foram pré-tratadas com Mitramicina, um inibidor do fator de

transcrição Sp1/Sp3. No entanto, análises da fosforilação de STAT1 em células THP-1 diferenciadas a macrófagos sugerem a participação de IFNs em células tratadas com o agonista de TLR4, mas não com TLR2. Os monócitos são uma das principais células da resposta imune inata sendo essenciais para defesa do hospedeiro contra uma gama de patógenos, tendo papel importante na septicemia. Assim, avaliamos e comparamos a sobrevivência de camundongos WT e PKR^{-/-} em modelo de sepse polimicrobiana. Os resultados revelaram que PKR parece ter um papel prejudicial ao hospedeiro, uma vez que a deficiência de PKR impede que os camundongos sucumbam à sepse grave. Nossos resultados demonstram que a expressão de PKR em monócitos humanos estimulados com agonistas TLRs bacterianos ocorre de modo independente de IFNs, e que os mecanismos de regulação de sua expressão envolvem fatores de transcrição críticos da resposta inflamatória. Além disso, os resultados obtidos de experimentos *in vivo* demonstram que PKR é um importante alvo para estudos de septicemia. Portanto, nosso estudo fornece uma nova visão sobre os mecanismos de ativação transcricional de PKR e de seu papel sobre a resposta imune inata contra componentes bacterianos.

Abstract

The role of protein kinase R (PKR) in the antiviral cell state induced by interferons (IFNs) is well known. The increase in its expression in response to stimulation by IFNs results in its autophosphorylation and phosphorylation of its substrate eIF2- α . This molecular event interferes with translation initiation of mRNA, which in turn results in inhibition of protein synthesis. Recent studies suggest the involvement of PKR in bacterial infections. However, how PKR is activated and what is its biological role in these infections is still largely unexplored. Thus, the central objective of our study was to examine the regulation of expression of PKR in the signaling pathway triggered by agonists of TLR2 and TLR4 in a human promonocytic, THP-1. THP-1 monocytes were treated with LPS (TLR4 agonist) or Pam3CSK4 (TLR2 agonist) in increasing doses or at different time intervals. At the end of these treatments, total RNA and protein extracts were obtained for analysis of the relative abundance of mRNA PKR by real time PCR and protein levels by western blot assays, respectively. The results showed a significant increase in the levels of mRNA PKR and PKR protein. Surprisingly, we did not observe any increase in the levels of transcripts of IFN-beta or subtypes of IFN-alpha. Moreover, treatment of THP-1 cells with LPS or Pam3CSK4 did not result in STAT1 phosphorylation. Supernatants taken from THP-1 cells treated with LPS or Pam3CSK4 did not caused the activation of PKR or ISG56 promoters in reporter gene assays carried out in HEK293T cells. These results provide evidence that in THP-1 monocytes exposed to stimulation with TLR4 and TLR2 agonists, neither transcriptional activation nor production of type I IFNs is observed, and therefore the PKR expression occurs in the absence of IFNs. Once the promoter region of PKR contains other regulatory elements as candidates for its expression regulation, including NF-IL6, NF- κ B, Sp1 and Sp3, we decided to assess the effect of three pharmacological inhibitors. The pretreatment of the THP-1 cells with TPCK or Bay11 7082, pharmacological inhibitors of the transcription factor NF- κ B, inhibited the PKR expression induced by bacterial agonists. The same was observed when cells were pretreated with Mithramycin, an inhibitor of Sp1/Sp3 transcription factor. However, analysis of the phosphorylation of STAT1 in THP-1 cells differentiated to macrophages suggests the involvement of IFNs in cells treated with the TLR4 agonist, but not with TLR2.

The monocytes are one of the major cells of the innate immune responses and are essential for host defense against a wide range of pathogens, having an important role in sepsis. We analyzed and compared the survival of WT and PKR-/- polymicrobial sepsis model. The results indicated that PKR appears to play a detrimental role to the host, as PKR-deficient mice survive from sepsis. Our results demonstrate that PKR expression in human monocytes stimulated with bacterial agonists TLRs occurs independently of IFNs, and that the regulatory mechanisms of its expression involve transcription factors that are critical in the inflammatory response. Furthermore, results obtained from the experiments *in vivo* demonstrate that PKR is an important target for studies of sepsis. Therefore, our study provides new insight into the mechanisms of transcriptional activation of PKR and its role on the innate immune response against bacterial pathogens.

1 - Introdução

1.1 - Sistema Imune Inato e Receptores do Tipo Toll (TLRs)

O sistema imune inato é essencial para sobrevivência dos organismos multicelulares e é encontrado tanto em animais invertebrados e vertebrados, assim como em plantas. Este é o primeiro sistema de reconhecimento e resposta à invasão de microrganismos (Albiger et al., 2007).

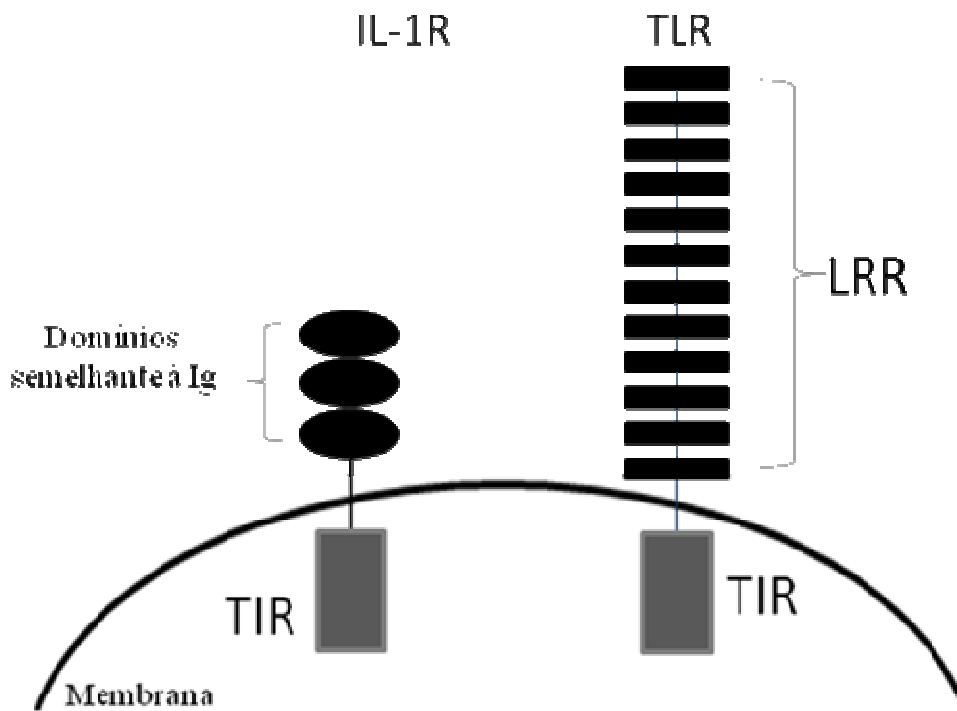
Até recentemente, a imunidade inata era considerada como sendo uma resposta imune não específica mediada por células fagocíticas. Contudo, em drosófilas, foi identificada uma proteína essencial que regula a polaridade dorsoventral durante a embriogênese, sendo denominada Toll (Anderson et al., 1985). Subseqüentemente foi mostrado que mutantes de drosófilas que apresentavam perda da função do Toll eram altamente susceptíveis à infecção por fungo. A partir desta observação pôde-se então sugerir que drosófilas expressam um receptor específico responsável por reconhecer e desencadear uma resposta a infecções causadas por fungos (Lemaitre et al., 1996).

Em 1997, um gene humano similar ao gene Toll (hToll) foi identificado e foi mostrado que seu produto era capaz de promover a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias e moléculas co-estimuladoras, sugerindo assim que Toll, em mamíferos, também desempenham um papel na resposta imune inata (Medzhitov et al., 1997).

Os receptores do tipo Toll (TLRs - *Toll-like receptors*) reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - *Pathogen-associated molecular pattern*), ativando cascatas de sinalização que regulam a expressão de moléculas

efetoras como as citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras (Jones et al., 2001). Assim como os PAMPs, os receptores TLRs foram descobertos na última década e são altamente diversificados. Sua família consiste de pelo menos 10 membros em humanos e 13 em camundongos (McGttrick e O`Neill 2010).

Os TLRs são proteínas transmembranas do tipo I e, como o Toll, são caracterizadas por um domínio extracelular contendo repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio intracelular ou citoplasmático homólogo ao do receptor de interleucina I (IL-1R – *interleukin-1 receptor*), sendo, portanto denominado domínio do receptor Toll/IL-1 (TIR) (Gay e Keith 1991). Os receptores de IL-1 possuem domínio extracelular semelhante ao de imunoglobulinas, enquanto os TLRs possuem repetições ricas em leucinas (Figura 1).



Adaptado de: Albiger et al, 2007

Figura 1 - Estrutura dos TLRs. Os receptores do tipo Toll e receptores de interleucina 1 (IL-1R) apresentam domínio citoplasmático conservado, denominado domínio TIR. No entanto, os domínios extracelulares desses dois receptores diferem drasticamente. Os TLRs possuem repetições ricas em leucinas (LRR), enquanto que os receptores de IL-1 possuem três domínios semelhantes à imunoglobulina.

Os receptores do tipo Toll podem ser divididos em dois grupos conforme sua localização celular. O primeiro desses grupos é composto por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR11 e TLR12, que são expressos em superfícies de células e reconhecem componentes de membrana microbiana, como lipídeos, lipoproteínas e proteínas. O segundo grupo é composto por TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, os quais possuem a habilidade de reconhecer ácidos nucleicos microbianos, encontram-se localizados no retículo endoplasmático e em vesículas intracelulares como endossomos, lisossomos e endolisossomos (Kawai e Akira 2010).

A primeira evidência que os TLRs de mamíferos reconheciam patógenos foi registrada através de estudos realizados com camundongos que apresentavam uma mutação de ponto que modifica um resíduo conservado do domínio citoplasmático de TLR4 (P712H). Essas observações ajudaram a elucidar o fenótipo hiporresponsivo à endotoxina bacteriana (LPS) observado em camundongos C3H/HeJ. Subsequentemente, gerações de camundongos deficientes para cada gene TLR, incluindo o TLR4, revelaram moléculas ou padrões moleculares associadas à patógenos (PAMPs) que podem ser reconhecidos por cada um deles (Poltorak et al., 1998; Hoshino et al., 1999).

Assim, posteriormente foi demonstrado que TLR2 associado ao TLR1 ou ao TLR6 tem a capacidade em reconhecer diversos componentes bacterianos incluindo peptidoglicanos, lipopetídeos e lipoproteínas de bactérias Gram-positivas e lipopeptídeos de micoplasma. Em particular, TLR1/2 e TLR2/TLR6 discriminam triacil-lipopopeptídeos e diacil-lipopopeptídeos, respectivamente (Takeuchi et al., 1999; 2000; 2001; 2002; Ozinsky et al., 2000). TLR3 reconhece RNA de dupla-fita (dsRNA) que é produzido por muitos vírus durante a replicação (Alexopoulou et al., 2001). TLR5 reconhece flagelina bacteriana (Hayashi et al., 2001). TLR7 reconhece componentes farmacêuticos sintéticos como o Imiquimod e Resiquimod (Hemmi et al., 2002). Esses compostos da família imidazoquinolona são conhecidos por apresentarem potente atividade antiviral e antitumoral. TLR7 apresenta alta homologia com TLR8 e também reconhece RNA de fita-simples (ssRNA) presente em vários vírus como da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1) (Heil et al., 2004), da estomatite vesicular (VSV) e o do influenza (Lund et al., 2004). TLR9 reconhece motivos de DNA não metilados (CpG) comumente presentes no genoma de bactérias e vírus e apresentam atividades

imunoestimulatórias (Hemmi et al., 2000), além de reconhecer pigmentos de hemozoína (Coban et al., 2005). TLR11 reconhece componentes ainda não conhecidos de bactérias uropatogênicas e moléculas semelhantes à profilina de *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky et al., 2005; Zhang et al., 2004). Após o reconhecimento de microrganismos patogênicos, TLRs desencadeiam vias de sinalização intracelulares que resultam na indução de citocinas inflamatórias, interferons do tipo I (IFN) e quimiocinas (Tabela 1). Até a conclusão desse trabalho, não foram ainda estabelecidas as moléculas ligantes para os TLRs-10, -12 e -13. Para TLR-13 foi apenas descrito que este receptor intracelular é ativado em resposta à infecção pelo vírus da estomatite vesicular (VSV) (Edelmann et al, 2004).

TLRs	Localização	Ligantes		
		Exógenos	Endógenos	Sintéticos
TLR1	Superfície celular	Lipopeptídeos		Triacil lipopeptídeos
TLR2	Superfície celular	Lipoproteínas/lipopeptídeos Peptidoglicanos Glicolipídeos Proteínas virais estruturais Zymosan	HSP60 HSP70 Ácido hialurônico	Diacil e triacil lipopeptídeos
TLR3	Endossomo	dsRNA ssRNA	mRNA	Poly (I:C)
TLR4	Superfície celular	Lipopolissacarídeos Proteínas de envelope (vírus) Glicoinositolfosfolipídeos	HSP60 HSP70 HMGB1 Fibrinogênio	
TLR5	Superfície celular	Flagelina		Diacil lipopeptídeos
TLR6	Superfície celular	Diacil lipopeptídeos Ácido lipotéico Zymosan		Diacil lipopeptídeos
TLR7	Endolisossomo	ssRNA	RNA endógeno	Oligonucleotídeos
TLR8	Endolisossomo	ssRNA	RNA endógeno	Oligonucleotídeos
TLR9	Endolisossomo	CpG-DNA (bactérias e vírus)	DNA endógeno	CpG oligodeoxinucleotídeos
TLR11	Superfície celular	Proteína tipo profilina (<i>T. gondi</i>)		

Modificado de: Manavalan et al, 2011; Kumar et al, 2011

Tabela 1. PAMPs reconhecidos por TLRs. Principais ligantes conhecidos dos receptores do tipo Toll e sua localização.

1.2 - Vias de Sinalização Induzidas por ligantes dos TLRs

Ao reconhecerem seus ligantes, a maioria dos TLRs recruta uma proteína adaptadora intracelular denominada fator de diferenciação mielóide (MyD88, *myeloid differentiation factor 88*). MyD88 possui dois domínios, um C-terminal que é similar ao domínio TIR e um domínio N-terminal também conhecido como domínio de morte (DD – *death domain*) (Medzhitov et al., 1998). TLRs e MyD88 interagem através de seus domínios TIR. Após ativação, o DD de MyD88 recruta membros da família cinase que contém DD, a família cinase associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK – *interleukin-1 receptor-associated kinase*), entre eles a

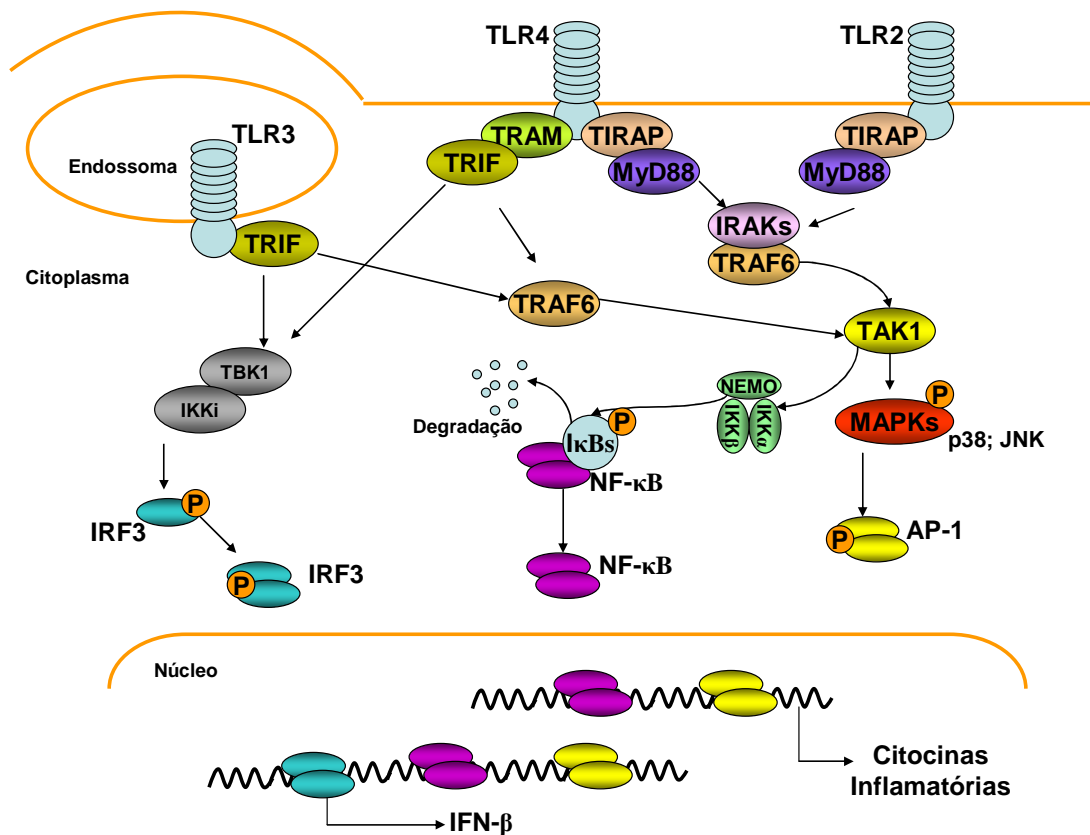
IRAK-1, -2, -M e -4. A IRAK-1 e 4 que possuem atividade cinase enquanto que IRAK-2 e M são cinases de “morte” (Janssens e Bayaert 2003).

Assim, IRAK é fosforilada e subsequentemente se associa ao fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF-6 – *TNF receptor associated factor*). TRAF6 ativada leva à ativação de um complexo formado pelas proteínas TAB1, TAB2, TAB3 e TAK1 (proteína cinase ativada por TGF- β – *transforming growth factor- β -activated protein kinase 1*). A ativação deste complexo leva a ativação de MAPKKK (proteína cinase cinase cinase ativada por mitógenos – *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), como p38, JNK (cinase N-terminal Jun – *Jun N-terminal kinase*), ERK (cinase regulada por sinal extracelular – *extracellular signal-regulated kinase*) (O`Neil 2003; Takeda et al., 2003) resultando na ativação do fator de transcrição AP-1 (*activating protein-1*). Concomitante, o complexo ativado TAB1, TAB2, TAB3 e TAK1 leva a ativação do complexo IKK. O complexo IKK fosforila o inibidor do fator de transcrição de NF- κ B (I κ B), liberando e ativando o mesmo (Muzio et al., 1997). Tanto AP-1 quanto NF- κ B ativados são translocados para o núcleo onde se ligam a regiões promotoras de genes que levam a síntese de citocinas pro-inflamatórias. Essa via descrita é conhecida como MyD88-dependente (Figura 2).

No entanto, TLR1/2, 2/6 e 4 sinalizam por esta via utilizando uma outra proteína adaptadora que também contém domínio TIR na região carboxi-terminal, porém não apresenta o domínio de morte na região amino-terminal. Essa proteína adaptadora é conhecida como proteína adaptadora que contém domínio TIR (TIRAP – *TIR domain-containing adapter protein*) ou adaptadora de MyD88 (MAL – *MyD88-like adaptor*) (Horng et al., 2001) (Figura 2). Dessa maneira, TIRAP forma dímeros com MyD88 desencadeando toda a via citada anteriormente.

TLR4, além de sinalizar pela via dependente de MyD88, também sinaliza simultaneamente por uma via independente de MyD88 que foi inicialmente sugerida nos estudos de Kawai e seus colaboradores em 1999 (Kawai et al., 1999). Nessa via, ao ser reconhecido o agonista, TLR4 recruta uma proteína adaptadora denominada TRAM (TRAM - *Trif-related adapter molecule* ou TICAM-2) que também contém domínio TIR que interage com o domínio TIR de TLR4 (Kawai et al., 2001; Fitzgerald et al., 2003) interagindo posteriormente com outra proteína adaptadora que também apresenta um domínio TIR, denominada TRIF (ou TICAM-1). Uma vez ativada, TRIF leva à ativação do complexo TBK1/IKK ϵ que por sua vez fosforila o fator regulador de interferon 3 (IRF-3 – *interferon regulatory factor 3*), levando a sua ativação e conseqüente dimerização e translocação para o núcleo onde se liga à região promotora do gene de IFN- β (Oshiumi et al., 2003; Fitzgerald et al., 2003).

Já o TLR3 sinaliza apenas pela via MyD88-independente e interage diretamente com TRIF, induzindo à síntese de interferon- β (IFN- β) através do fator de transcrição IRF3, uma via que é crucial para imunidade anti-viral (Hemmi et al., 2004). Muito embora o TLR3 esteja envolvido no reconhecimento de RNA de fita-dupla, já foi demonstrado que a falta do TLR3 prejudica apenas parcialmente o reconhecimento deste agonista (Yamamoto et al., 2003). Isso ocorre porque o poly-IC, um dsRNA sintético que mimetiza RNA de fita-dupla viral, pode desencadear a produção de IFNs do tipo I através de outros componentes celulares como a proteína cinase dependente de RNA de fita-dupla (PKR - *double-stranded RNA-dependent protein kinase*) (Diebold et al., 2003) e a RNA helicase MDA-5, um receptor tipo RIG-I (RLR, *RIG-I like receptor*) (Meylan e Tschopp 2006) (Figura 2).



Modificado de Kawai e Akira 2006.

Figura 2: Vias de sinalizações mediadas por TLR2; TLR3; TLR4

Os interferons (IFNs), sintetizados em resposta à ativação dos TLRs e de receptores semelhantes a RIG-I (RLRs, *RIG-I like receptors*) (Schlee et al., 2010) e posteriormente secretados no meio extracelular, foram os primeiros membros identificados de uma superfamília de proteínas regulatórias denominadas citocinas. Em 1957, Issacs e Lindemann descobriram que essas proteínas eram capazes de induzir um estado antiviral nas células (Issacs e Lindemann 1957). Até o momento, diversas outras funções foram atribuídas a esse grupo como, por exemplo, crescimento e diferenciação celular e com a imunomodulação (Stark et al., 1998).

Os IFNs são divididos em três grupos: IFNs do tipo I, IFN do tipo II e IFNs do tipo III, que são produzidos por células de vertebrados em resposta a uma grande variedade de estímulos. O IFN-gama é o único do tipo II e é produzido por linfócitos T e células natural killer (NK) ativadas por antígenos ou agentes mitogênicos como a fitohemaglutinina e a concavalina-A e ao dsRNA. Já os IFNs do tipo I são produzidos em resposta à infecção viral, dsRNA, endotoxinas bacterianas, micoplasma, rickettsia e a indutores sintéticos como polinucleotídeos e são subdivididos em: alfa, beta, delta, epsilon, kappa, ômega e tau (Stark et al., 1998; Kontsek et al., 2003). Os IFNs do tipo III consistem de IFN- λ 1, - λ 2, - λ 3, também denominados IL29, IL28A e IL28B. Células tratadas com IFNs- λ , apresentam resistência aos efeitos citopáticos induzido por infecções virais (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2001).

Quando sintetizados os IFNs do tipo I são liberados no meio extracelular e são reconhecidos por um único receptor celular pertencente a família de receptores de citocinas de classe II e é constituído de duas subunidades denominadas IFNAR1 e IFNAR2, que se associam a Tyk2 e Jak1, respectivamente. Assim, ocorre a transfosforilação dessas proteínas levando a fosforilação de tirosinas na cadeia citoplasmática dos receptores. Este resíduo fosforilado torna possível a interação das proteínas STAT1 e STAT2 com o complexo IFN-receptor, através dos sítios SH2 existentes nas STATs. Após fosforilação, heterodímeros de STATs são formados (STAT1-STAT2) e se associam ao fator de transcrição p48, formando o complexo transcricional ISGF3. Esse complexo migra para o núcleo onde se liga a seqüências dos elementos responsivos estimulados por IFNs (ISRE, *IFN-stimulated response element*), induzindo a transcrição de genes induzidos por IFNs (ISGs), tais como: a proteína

cinase ativada por RNA dupla fita (PKR), 2'-5'(A) Oligodenilato sintetase, fatores reguladores de IFNs (IRF-1, IRF-2, IRF-7), Mx1, GBP, dentre outros (Platanias 2005; Lau et al., 2002; Levy et al., 2001).

TLRs induzem interferons do tipo I através da ativação de membros da família de fatores reguladores de IFNs. Essa família em mamíferos é composta de 9 membros IRF1, IRF2, IRF3, IRF4 (também denominado LSIRF, PIP ou ICSAT), IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 (também denominado ICSBP) e IRF9 (também denominado ISGF3 γ). Os fatores de transcrição mais bem caracterizados e que são cruciais para indução de IFN-I são IRF3, IRF7 e ISGF3 (Honda e Taniguchi 2006; Colonna 2007; Nagarajan 2011).

A indução de IFN- α ou IFN- β pelas vias de sinalização de TLRs é dependente do ligante, do tipo celular e da ativação dos diferentes IRFs. Assim TLR3 e TLR4 induzem IFN- β pela ativação de IRF-3. Já TLR9 induz tanto IFN- α e IFN- β através da ativação de IRF7 em células dendríticas plasmacitóides pelo reconhecimento de CpG do tipo A. No entanto, em células dendríticas e macrófagos o reconhecimento de CpG tipo B por TLR9 induz apenas a síntese de IFN- β pela ativação de IRF-1 (Honda e Taniguchi 2006; Colonna 2007; Nagarajan 2011).

1.3 - PKR

A proteína cinase dependente de RNA de dupla fita (PKR) é uma proteína citossólica codificada por um gene estimulado por interferons (IFNs) sendo, portanto, um gene cuja expressão é induzida por IFNs nas infecções virais. PKR é ativada pela ligação ao RNA de dupla-fita. PKR apresenta níveis de expressão

relativamente baixas nas células e existe como uma molécula de 65 kDa em células murinas e 68 kDa em células humanas.

PKR humana consiste de 551 aminoácidos, com um domínio catalítico serina/treonina em sua porção carboxi-terminal (resíduos 258-551). A região regulatória amino-terminal de PKR consiste de dois domínios de ligação ao RNA de fita-dupla (dsRBDs). Sua atividade é essencial em vertebrados superiores de modo a suprimir de maneira efetiva o alastramento de diferentes vírus nesses organismos e também é um regulador chave da síntese de proteínas e da transcrição gênica (Nanduri et al., 2000).

Em condições de estresse celular tais como infecções virais ou estimulação por dsRNA sintéticos, PKR sofre mudanças conformacionais que resultam na autofosforilação levando à interação e fosforilação de diferentes componentes celulares incluindo a proteína cinase cinase MKK6 regulatória da p38 MAP cinase (Silva et al., 2004), a subunidade regulatória da proteína fosfatase 2A (B56- α) (Xu e Williams (2000) e a subunidade alfa do fator de iniciação da tradução em eucariotos (eIF2 α) (Panniers e Henshaw 1983). O eIF2 α é o substrato mais bem caracterizado de PKR nas respostas imune anti-virais (Nonato et al., 2002).

A subunidade α do fator de iniciação da tradução do mRNA em eucariotos eIF2 α é um componente do complexo ternário e estável formado por Met-tRNA_i^{Met}, GTP e eIF2. A formação deste complexo é um passo essencial na montagem da subunidade ribossomal 40S e subsequente síntese protéica efetiva (Pain 1996).

A fosforilação de eIF2 α no resíduo serina 51 causa uma dramática inibição da síntese de proteínas na célula pelo seqüestro do fator de troca do nucleotídeo guanina (eIF2B), um componente chave da maquinaria de tradução. O seqüestro

de eIF2B previne a mudança de GDP para GTP em eIF2 e inibe a iniciação da síntese de proteínas (Proud 2005). Dessa forma, o efeito antiviral de PKR ocorre através da inibição de síntese protéica, impedindo a multiplicação de vírus, podendo até levar a morte da célula por apoptose (Der et al., 1997). Em um estudo foi proposto que ativação pela dimerização do domínio catalítico leva a autofosforilação de treonina 446 e reconhecimento de eIF2 α (Dey et al., 2005).

Além disso, PKR integra e transmite esses sinais não somente a eIF-2 α , mas também para vários outros fatores como STAT, IRF1, p53, JNK e p38, e também esta envolvida na via de NF- κ B (Williams 2001; Pindel e Sadler 2011). PKR também está envolvida nos processos de morte celular por apoptose através da indução da expressão de Fas através da via de sinalização FADD/caspase-8 (Balachandran et al., 1998).

O papel de PKR tem sido estudado extensivamente ao longo de vários anos nas infecções virais. No entanto, estudos recentes têm demonstrado a sua relevância nas infecções causadas por bactérias ou por seus produtos e parasitas (Hsu et al., 2004; Cheung et al., 2005; Cabaski et al., 2007; Pereira et al., 2010; Vivarini et al., 2011).

Em seu trabalho publicado em 2004, Hsu e colaboradores mostram que macrófagos obtidos de camundongos deficientes de TRIF-1 apresentavam baixos níveis de expressão de PKR, sugerindo potencial importância dessa molécula adaptadora para expressão de PKR em resposta ao estímulo (Hsu et al., 2004). Porém, o mecanismo molecular envolvido ou hipóteses não foram abordados para especular esta observação.

Já Cheung e colaboradores (2005), ao utilizarem monócitos humanos do sangue periférico estimulados com bacillus de Calmette-Guérin, observaram que

essas células expressavam IL-6, IL-10 e TNF- α de maneira dependente de PKR. Embora os níveis de expressão de PKR não tenham sido determinados nessas células, esses autores concluíram que PKR possui um papel crítico na regulação da resposta imune a infecções causadas por micobactérias, suportando a hipótese que PKR é importante para resposta imune inata desencadeada por bactérias (Cheung et al., 2005).

Além disso, a fosforilação de PKR é observada quando macrófagos alveolares murinos são estimulados por LPS e Pam3CSK4 resultando na produção de citocinas inflamatórias, cuja síntese parece ser dependente da fosforilação de PKR. PKR ativada nessas células pode regular a fosforilação de JNK1/2 induzida pelo tratamento com os dois agonistas. Entretanto, a ativação de NF- κ B, também regulada por PKR, é induzida apenas através da ativação de TLR4. Assim, esses dados sugerem que a fosforilação de PKR é um passo importante na resposta inflamatória mediada por TLR2 ou por TLR4, pelo menos em camundongos (Cabaski et al., 2007).

1.3.1 – Regulação gênica de PKR

O gene *EIF2AK2*, o qual codifica PKR, é constitutivamente expresso em todos os tecidos em níveis baixos, e é fortemente induzido por uma variedade de respostas associadas ao estresse (Ank et al., 2006). A expressão de *EIF2AK2* é coordenadamente regulada pelos elementos de resposta à estimulação por IFNs (ISRE), pela sequência cinase conservada (KCS), assim como pelos fatores de transcrição Sp-1 e Sp-3 que se ligam em sítios GC presentes na região KCS, e pela proteína supressora de tumor p53 (Ward e Samuel 2002, 2003; Das et al., 2006; Yoon et al., 2009). Foi demonstrado que p53 induz diretamente o promotor

de *eif2ak2* através de um elemento de resposta que está dividido pelo sítio de ISRE (Yoon et al., 2009).

Possíveis funções para os fatores de transcrição Ets, myb, NF- κ B, antigênio de diferenciação miogênica (MyoD) e o gene E2F também têm sido propostas baseadas na identificação de elementos regulatórios para estes fatores de transcrição no promotor do gene (Tanaka e Samuel 1994). Além disso, sítios semelhantes a elementos de ativação de IFN- γ foram identificados tanto no gene *eif2ak2* humano quanto no murino, no entanto esses elementos não parecem ser funcionais (Tanaka e Samuel 2000; Xu e Williams 1998).

A expressão de PKR também é regulada pós-transcricionalmente. O aumento dos níveis de PKR conduz à sua ativação. Uma vez ativada, PKR regula a expressão do seu próprio mRNA através da inibição global da iniciação da tradução (Thomis e Samuel 1992). Esse mecanismo também pode ser aplicado para outros genes estimulados por IFNs (ISGs). Assim em células onde PKR está inativa a tradução de ISGs é permitida, no entanto é restrita nas células onde PKR é ativada em resposta a via de sinalização de IFNs. Portanto entender o mecanismo de adaptação à resposta a IFNs precisa ser explorado (Garaigorta e Chisari 2009).

1.3.2 – Ativação de PKR

Conforme mencionado acima, PKR pode ser ativada pelo dsRNA, por moléculas polianiónicas como a heparina, sulfato de dextrano, sulfato de condroitina e poli L-glutamina e por caspases (Bergeron et al., 2000; Fasciano et al., 2005). Até o momento não foram descritos nenhum mecanismo que acarrete a

ativação de PKR pelas moléculas polianiónicas. Acredita-se que elas se liguem aos motivos de ligação ao RNA (RBMs), com exceção da heparina que parece ligar ao domínio cinase (Fasciano et al., 2005). Já a ativação de PKR por caspases envolve a clivagem proteolítica de PKR no resíduo da asparagina 251 pelo iniciador apoptótico caspase-8 e pelos efetores caspase-3 e -7 (Saelens et al., 2001).

Além da ativação direta de PKR, PKR também é ativada indiretamente e subsequentemente por uma rede de sinalização celular. PKR responde indiretamente a IL-1, IFN- γ , fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento derivado de plaquetas, assim como por uma variedade de moléculas associadas a patógenos e estímulos de estresse (Cheshire et al., 1999; Goh et al., 2000; Ramana et al., 2000; Deb et al., 2001).

A associação desses ligantes a seus receptores conduz a vias de transdução de sinal que ativam fatores de transcrição citoplasmáticos latentes. Até o momento foram relatados os seguintes fatores de transcrição regulados por PKR: NF- κ B, c-jun, STAT1 e STAT3, e os fatores de ativação transcricional (ATF – *activating transcription factors*) 3 e 4 (Tanaka e Samuel 1994; Wong et al., 1997; Gil et al., 2000; Deb et al., 2001; Guerra et al., 2006; Lee et al., 2007). Desses fatores de transcrição, apenas a regulação de ATFs por PKR tem um mecanismo claramente estabelecido. O mRNA de ATF-3 e ATF-4 possui múltiplos sítios de início da tradução. Essa característica do mRNA promove a tradução em consequência à fosforilação de eIF2- α . Assim a indução de ATF-3 e -4 dependente de PKR ocorre através do controle de eIF2- α (Guerra et al., 2006). Já a ativação dos outros fatores de transcrição por PKR ocorre independentemente da fosforilação de eIF2- α . Com relação à NF- κ B, PKR parece

afetar a sua atividade pela associação com o complexo I κ B (Gil et al., 2004). Um plausível mecanismo de ativação de NF- κ B e outros fatores de transcrição por PKR foi demonstrado pelo envolvimento da proteína ativadora de proteínas cinases induzidas por IFNs (PACT – *protein activator of the IFN-inducible protein kinase*) e pelos fatores associados à TNFR (TRAFs – *TNFR-associated factors*).

TRAFs tem um papel principal nas vias de sinalização desencadeadas por patógenos. Significativamente, motivos consensos de TRAF em PKR estão associados com o sinal disparado pelos receptores do tipo Toll e helicases semelhantes à RIG que então recrutam TRAFs para ativar NF- κ B, através de TRAF-2 e -6 (Yamashita et al., 2008; Sondarva et al., 2010). Experimentos recentes têm explorado a não ativação de NF- κ B induzida por TNF- α em decorrência da deleção de PKR, corroborando essa associação de TRAFs numa sinalização dependente de PKR (Takada et al., 2007).

PACT codifica 3 RBMs que medeiam a interação com PKR (Huang et al., 2002). Embora PACT codifique 3 RBMs e ligue-se ao dsRNA, PACT pode ativar PKR independentemente do dsRNA (Peters et al., 2001). Sinais de estresse celular resultam na fosforilação de PACT na serina 18, seguida de pela interação com PKR (Bennett et al., 2004). A ativação de NF- κ B, IRF-1 e STAT1 mediada por PKR também é mediada por PACT, uma vez que células que não expressam a forma ativa de PACT tem uma atenuação da expressão desses fatores de transcrição. O requerimento de PACT na ativação desses fatores de transcrição não contradiz a sinalização mediada por TRAFs. PACT poderia fornecer um sinal de ativação que então permitiria PKR associar-se com TRAFs engatilhando a subsequente ativação de vários fatores de transcrição (Yoshida et al., 2012).

1.4 – Os fatores de transcrição Sp e NF-κB

1.4.1 – Sp

Sp1, foi o primeiro membro identificado da família Sp. O nome Sp1 é um acrônimo derivado de sua descrição original como proteína específica 1. Sp1 foi o primeiro regulador sequencia específico de transcrição gênica de mamíferos, por ter sido identificada sua capacidade para se ligar e ativar sítios ricos em GC no início do promotor do vírus SV40 (Kadonaga, et al., 1987). Desde então mais 7 membros foram identificados e foram numerados de Sp2-8, de acordo com a ordem de descoberta (Bouwman e Philipsen 2002). O papel funcional desses membros tem sido estudado, mas Sp1 e Sp3 têm sido mais explorados.

Sp1 e Sp3 têm expressão ubíqua, enquanto que a expressão de Sp4 é restrita ao cérebro e no desenvolvimento dos testículos. A expressão de Sp2 é observada numa serie de linhagens celulares, no entanto, não existem dados disponíveis sobre os níveis de expressão em tecidos (Kingsley et al., 1992). Sp7 foi identificado como um fator de transcrição específicos dos ossos requerido para diferenciação de osteoblastos e formação óssea (Nakashima et al., 2002). Os modelos de expressão de Sp5, Sp6 e Sp8 precisam ser investigados. Os primeiros 4 membros da família Sp, Sp1-4, estão mais estreitamente relacionados uns com os outros do que Sp5-8. Sp1-4 possuem um domínio de ativação N-terminal e um domínio de ligação ao DNA C-terminal. Sp3 também contem um domínio inibitório que acredita se mediar a supressão da ativação de Sp3. Também acredita se que Sp3 inativo ou fracamente ativo age como um repressor de genes ativados por Sp1 por competir com os mesmos sítios de ligação (Hagen et al., 1992). As proteínas Sp 2-8 são menores, não possuem o domínio de

ativação N-terminal de Sp1-4 o que pode explicar o reduzido potencial de ativação transcricional (Marin et al., 1997).

Sp1 e Sp3 são alvos de modificações pós-traducionais. Essas modificações contribuem para suas funções tecido específico. A proteína Sp1 é modificada por acetilação, glicosilação e fosforilação, enquanto que Sp3 sofre acetilação o que promove a sua inibição (Chun et al., 1998; Iwahori et al., 2007; Hung et al., 2006; Braun et al., 2001; Goldberg et al., 2006). Existe somente um único transcrito de Sp1, mas a fosforilação gera duas isoformas de Sp1 nas células mieloides; a isoforma de 95-kDa que não é fosforilada e outra de 105-kDa é fosforilada. Além disso, uma terceira forma menor encontrada em células mieloides. Essa isoforma dominante negativa de 30-kDa é gerada pela degradação da proteína nas células mieloides. Para cada uma dessas isoformas de Sp1 parecem ter um papel diferente na modificação da regulação tecido-específica de genes mielóides (Rao et al., 1998).

A fosforilação de Sp1 parece contribuir para ativação tecido específica de alguns genes mieloides específicos. Sp1 é um importante regulador do promotor de CD14 (Resendes e Rosmarin 2004). CD14 é uma molécula importante no reconhecimento de LPS e Pam3CSK4. Já foi demonstrado também que a molécula CD14 é capaz de interagir fisicamente com os agonistas TLRs: triacillipopeptídeos, RNA fita-dupla, peptidoglicano e LPS (Nakata et al., 2006; Lee et al., 2006; Dziarski et al., 2000; Kim et al., 2005), participando de forma importante das vias de sinalização desencadeada por esses. Além de se associar a esses agonistas, CD14 também é capaz de se associar com TLR4 e juntamente com a proteína de ligação ao LPS (LBP) são essenciais para ativação desse

receptor por este agonista (Muta e Takeshige, 2001). CD14 também é expresso após o processo de diferenciação (Schwende et al., 1996).

Os fatores Sp são conhecidos por regularem aproximadamente 20 genes mielóides específicos, incluindo moléculas de adesão celular, cinases e proteínas granulares. Alguns exemplos são CD11b, CD11c, PU.1, mieloperoxidase, CD18, c-fes, dentre outros. Alguns desses *boxes* GC se associam exclusivamente por Sp1 ou Sp3, enquanto que outros podem se ligar a outros fatores (Resendes e Rosmarin 2004).

1.4.2 - NF- κ B

Sen e Baltimore (1986) descreveram NF- κ B como um fator de transcrição nuclear que se ligava a uma região reguladora do gene da cadeia leve kappa (sítio κ B) em células B. Desde então, o NF- κ B se tornou um dos mais estudados fatores de transcrição, pois é essencial na resposta imune inata e adaptativa. Além disso, sabe-se hoje que sua ativação tem um papel fundamental em vários processos biológicos, como na inflamação, na apoptose, na proliferação celular e em várias patologias, inclusive no câncer (Siebenlist et al., 2005; Karin e Greten 2005; So e Ouchi 2010; Tilstra et al., 2011).

NF- κ B é uma proteína dimérica, cujos monômeros pertencem à família das proteínas Rel/ NF- κ B. Em mamíferos, essa família é constituída por p105 (NF- κ B1; o precursor de p50), p100 (NF- κ B2; o precursor de p52), REL/cREL, REL-A (também conhecido como p-65) e REL-B. Essas proteínas dimerizam para formar NF- κ B. Todas as combinações homo ou heterodímeras são possíveis e contribuem para a atividade de NF- κ B, com exceção da REL-B, que interage

apenas com p50 ou p52. Todos os membros da família possuem um conservado domínio de homologia REL (RHD - *rel-homology domain*), de aproximadamente 300 aminoácidos, o qual apresenta três motivos: um para a ligação específica a sequências de DNA; um para a dimerização; e um para a localização nuclear, conhecido como sinal de localização nuclear (NLS - *nuclear-localization signal*). Esse domínio de homologia REL (RHD) permite a ligação de NF- κ B à sequências no DNA conhecidas como sítios κ B (5-GGGRNNYYCC-3; R, A ou G; Y, C ou T; N, qualquer nucleotídeo) presente na região promotora de vários genes (Kawai e Akira 2007; Siebenlist et al., 2005; Karin e Greten, 2005). As proteínas REL, REL-A e REL-B possuem também o domínio de transativação (TAD - *transactivation domain*), responsável pela ativação de promotores gênicos, por interagir com o aparato transcricional da célula (Siebenlist, et al., 2005).

Em células não estimuladas, o NF- κ B é mantido inativo no citoplasma pela interação com membros da família de proteínas inibitórias I κ B. (Ghosh e Hayden 2008).

Existem vários sinais que ativam NF- κ B. Ligantes de receptores do tipo Toll (TLRs) como LPS via TLR4, flagelina via TLR5, CpG via TLR9 são potentes ativadores. Fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1), duas principais citocinas pró-inflamatórias, são ativadores como também alvos transcripcionais de NF- κ B. Outros ativadores incluem receptores de antígenos encontrados em células imune adaptativas, como o receptor de células T (TCR) e o receptor de células B (BCR), além de outros receptores como CD40, BAFFR, RANK e LT- β R. Adicionalmente, fatores de crescimento, como exemplo, o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) ativa NF- κ B (Tilstra et al., 2011; Siebenlist et al., 2005).

A ativação de NF- κ B acontece através de duas principais vias: a via clássica (canônica) e a via não-clássica ou alternativa (não-canônica).

Entre as vias de sinalização que culminam na ativação clássica de NF- κ B, está a via mediada pelos receptores do tipo Toll. Todos os TLRs ativam NF- κ B através da via dependente de MyD88 ou TRIF ou ambas conforme descrito acima (Tilstra et al., 2011; Kawai e Akira, 2007).

A via de sinalização alternativa acontece no desenvolvimento de órgãos linfóides, o qual é requerido para o desenvolvimento de células B e T. Nela o heterodímero formado é o p52-REL-B. Essa via é desencadeada por um número limitado de receptores (CD40, LT β , BAFF, RANK). Um estímulo, através de qualquer um desses receptores, ativa o homodímero IKK α , e não IKK γ ou IKK β . Esse complexo fosforila p100, ocasionando seu processamento em p52. REL-B e p52 formam um heterodímero e translocam para o núcleo para regular a transcrição de genes alvos (Tilstra et al., 2011; Kawai & Akira, 2007).

Centenas de genes são reguladas por NF- κ B. Entre esses estão incluídos genes que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas co-estimuladoras, imunoreceptores, como também proteínas em resposta a estresse, fatores de crescimento e seus receptores. A maioria dos genes regulados pelo NF- κ B estão envolvidos na resposta imune, inflamação, apoptose e proliferação celular (Karen e Greten, 2005; Kawai e Akira, 2007; Tilstra et al., 2011).

NF- κ B regula genes envolvidos com a diferenciação de vários tipos de células imunes. Monócitos são diferenciados a macrófagos após serem recrutados para o sítio da infecção e serem expostos no local a citocinas do meio. Macrófagos diferenciados podem ser divididos em dois tipos baseados tanto na função quanto na expressão de citocinas. Macrófagos M1 produzem IL-1, IL-6,

TNF- α , dentre outras citocinas inflamatórias e como resultado recrutam neutrófilos e também ativam linfócitos conduzindo a resposta imune adaptativa. Linfócitos T ativados proliferam e liberam mais citocinas incluindo IFN- γ , IL-6 e TNF- α , acarretando a diferenciação de mais macrófagos M1 o que recruta mais linfócitos T. Macrófagos M1 e Linfócitos T estão relacionados com as doenças inflamatórias crônicas. A segunda classe de macrófagos, M2, participam da resposta a lesões epiteliais. Macrófagos M2 secretam a citocina anti-inflamatória IL-10. A diferenciação de monócitos em Macrófagos M1 ou M2 dependente da ativação de NF- κ B, em resposta a citocinas produzidas por linfócitos ou por outras células do sistema imune, é um fator crítico nas doenças metabólicas inflamatórias (asma, artrite reumatoide, diabetes) (Mantovani et al. 2005; Gordon e Martinez 2010).

Assim a ativação da via de NF- κ B está envolvida na patogênese das doenças inflamatórias crônicas tais como a asma, artrite reumatoide e doença inflamatória do intestino. Além disso, alterações na regulação de NF- κ B podem estar relacionadas com outras doenças (aterosclerose e Alzheimer), nas quais a resposta inflamatória esta pelo menos em parte envolvida. Finalmente, anormalidades na via de NF- κ B estão também frequentemente envolvidas em uma variedade de cânceres humanos (Mantovani et al., 2005).

1.5 - Interferons do tipo I e as infecções bacterianas.

Embora interferons do tipo I sejam conhecidos por induzirem de forma robusta a resposta antiviral do hospedeiro, o papel de IFNs do tipo I na resposta bacteriana é variável e muitas vezes prejudicial para o hospedeiro. Por exemplo, IFNs do tipo I desempenham um importante papel na mediação da patologia no choque séptico induzido por LPS (Karaghiosoff et al., 2003). Surpreendentemente

alguns estudos tem mostrado que IFNs do tipo I podem agir prejudicando a eliminação de bactérias. Camundongos deficientes do receptor de IFN do tipo I (IFNAR) apresentam um número reduzido de *Listeria monocytogenes*, no fígado e no baço quando comparado com esses órgãos de camundongos selvagens (Auerbuch et al., 2004; Carrero et al., 2004; O'Connell et al., 2004). Além disso, IFNs do tipo I prejudicam a eliminação de *Chlamydia* do trato genital e pulmão durante a infecção com diversas linhagens de *Mycobacterium* (Nagarajan et al., 2008; Qiu et al., 2008) e também prejudica a sobrevivência de camundongos durante a infecção com *Francisella tularensis* (Henry et al., 2007). Uma possibilidade pelo qual IFNs do tipo I agem de forma prejudicial em alguns quadros de infecções bacterianas é devido a eles predispor a linfócitos a apoptose acarretando a supressão da resposta imune inata *in vivo* (Carrero e Unanue 2006). Outra possibilidade é que IFNs do tipo I estimulam a produção de IL-27, uma citocina que suprime fortemente a produção de IL-17A que parece ter um papel importante na eliminação de bactérias mediada por neutrófilos (Guo et al., 2008; Meeks et al., 2009; Henry et al., 2010).

No entanto, em alguns processos de infecção bacteriana IFNs do tipo I têm um papel crucial na resistência a infecção. Por exemplo, camundongos deficientes do receptor de IFN do tipo I têm a sobrevivência reduzida e um aumento da carga bacteriana durante infecções com *Streptococcus* do grupo B, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. A suscetibilidade desses camundongos a essas infecções correlacionam-se com a redução da produção de citocinas tais como TNF- α e IFN- γ . (Mancuso et al., 2007). Assim, no contexto das respostas as infecções, IFNs do tipo I parecem ter uma variedade de funções imunes benéficas e prejudiciais muitas das quais precisam ser bem entendidas.

Por isso a importância de estudos relacionados à via de sinalização de IFNs do tipo I e de genes ativados por essa via em células do sistema imune no contexto das infecções bacterianas.

1.6 – Monócitos

Monócitos são um subgrupo de células da série branca do sangue que podem se diferenciar em macrófagos e em células especializadas como células dendríticas (DC – dendritic cells). Constituem aproximadamente 5 a 10% dos leucócitos humanos e estão presentes em mamíferos, aves, anfíbios e peixes. Monócitos sanguíneos são derivados de células precursoras na medula óssea e medeiam defesa antimicrobiana, estão implicados em muitas doenças inflamatórias como aterosclerose e podem ser recrutados para sítios de tumor. Além de reconhecerem microrganismos essas células são capazes de reconhecer lipídios e células mortas (Shi e Pamer 2011).

Durante processos infecciosos monócitos e células derivadas de monócitos podem também entrar nos nódulos linfáticos e promover uma resposta imune adaptativa (Shi e Pamer 2011).

Os monócitos são divididos em 3 subgrupos baseados na expressão de CD14 e CD16. Monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) são os mais prevalentes no sangue humano, são similares aos monócitos LY6C_{hi} e expressão o receptor de quimiocina 2 CCR2 (CC-chemokine receptor 2). Já a população que expressa CD16 é dividida em dois subgrupos: os monócitos intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e os monócitos não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Os monócitos CD14⁺CD16⁺⁺ são similares aos monócitos murinos LY6C^{low}. Tanto

monócitos clássicos quanto não clássicos expressão o receptor de quimiocina 1 CX3CR1 (CX3C-chemokine receptor 1) (Auffray et al., 2009).

Em resposta ao LPS monócitos clássicos sintetizam IL-10, G-CSF, CCL2, RANTES, IL6 e IL-8; monócitos intermediários sintetizam IL-6 e IL-8 enquanto que monócitos não clássicos sintetizam TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 (Wong et al., 2012).

Monócitos clássicos estão relacionados com processo de fagocitose, já monócitos intermediários estão envolvidos com estimulação e proliferação de células T, com a angiogênese e síntese de espécies de oxigênio reativo (ROS - *reactive oxygen species*), enquanto que monócitos não clássicos também estão envolvidos com estimulação e proliferação de células T (Wong et al., 2012).

As células THP-1 foram obtidas de um paciente com leucemia monocítica aguda. Desde então essa linhagem de célula é utilizada como um modelo de estudo da resposta imune de monócitos e macrófagos (Tsuchiya et al., 1980). Comparada com outros tipos de células mieloides como HL-60 e U937, células THP-1 diferenciadas se assemelham mais aos macrófagos derivados de monócitos no sangue (Auwerx 1991). As células THP-1 também apresentam respostas similares a de monócitos obtidos de frações presentes em células mononucleares do sangue periférico (*PBMCs - peripheral blood mononuclear cells*) como demonstrado em um estudo que sugere que essas células são um bom modelo para estudo de mecanismos da expressão gênica dependente de LPS e NF- κ B (Sharif et al., 2007).

Além disso, mimetizam *in vitro* várias funções fisiológicas como, por exemplo, as respostas exibidas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e neutrófilos obtidos de pacientes que apresentam quadro clínico de septicemia (LaRue et al., 1994). Também são utilizadas como modelo para estudo

da função e regulação de monócitos e macrófagos no sistema cardiovascular e na periodontite (Baqui et al., 1998; Qin 2011; Yee et al., 2012).

2 – Justificativa

As infecções bacterianas têm sido extensivamente estudadas, e diversos estudos têm ajudado a desvendar os mecanismos moleculares associados a este processo. Estudos recentes têm demonstrado que a proteína cinase PKR, cujo papel em infecções virais já é bastante conhecido, emerge como um importante mediador das respostas desencadeadas pelas infecções bacterianas.

PKR é uma proteína cinase reguladora chave da síntese protéica e é ativada por interferons (IFNs) e RNA de fita-dupla (dsRNA) gerado em infecções virais. Embora múltiplas funções fisiológicas de PKR tenham sido reveladas, o seu envolvimento sobre a iniciação da tradução do mRNA, sobre a ativação transcricional, durante o processo inflamatório desencadeado por agonistas não-virais é desconhecido.

No entanto, temos evidências preliminares mostrando que a inibição da síntese protéica induzida pelo tratamento com LPS é prejudicada em esplenócitos deficientes de PKR e em monócitos THP-1 tratadas com esse agonista.

Monócitos, neutrófilos e macrófagos são fagócitos profissionais que desempenham papéis importantes na defesa do hospedeiro como críticos componentes celulares do sistema imune inato. Estes leucócitos têm a capacidade de reconhecer rapidamente os patógenos, mediar a fagocitose, e responder com a produção de oxigênio reativo e espécies de nitrogênio, peptídeos antimicrobianos, e mediadores inflamatórios.

Monócitos não aparentam ser células eficientes na síntese de interferons a não ser quando primadas com IFN- γ ou com fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) esses fatores também causam um robusto

efeito na expressão de TLR2 e TLR4 nessas células. Além disso, monócitos diferenciados a macrófagos expressão significativamente mais TLR4 após tratamento com LPS quando comparados com monócitos submetidos ao mesmo tratamento. Dados da literatura também mostram a ativação de PKR por agonistas que não acarretam a síntese de IFN-I em macrófagos alveolares

Assim, levando em consideração os dados abordados acima, levantamos a hipótese de que PKR poderia ser expressa em monócitos humanos na ausência de IFN-I em resposta aos agonistas TLR2 (Pam3CSK4) e TLR4 (LPS).

Para esse fim utilizamos células THP-1 por serem uma linhagem promonocitária humana que expressam baixos níveis de CD14, se diferenciam a células semelhantes à macrófagos e mimetizam *in vitro* varias funções fisiológicas como, por exemplo, as respostas exibidas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e neutrófilos obtidos de pacientes que apresentam quadro clínico de septicemia.

A relevância deste trabalho está no fato de que estes estudos nos ajudarão a compreender o modo como a proteína cinase PKR é expressa durante processos inflamatórios bacterianos na ausência de interferon do tipo I.

3 – Objetivos

OBEJTIVO GERAL:

Definir o modo de regulação da expressão de PKR na resposta celular a agonistas bacterianos dos receptores TLR2 e TLR4.

OBEJTIVOS ESPECÍFICOS:

1) Examinar os níveis do mRNA e protéicos de PKR em promonócitos humanos THP-1 estimulados com os agonistas inflamatórios dos receptores TLR2 e TLR4.

- a) Avaliar a abundância relativa dos mRNAs de PKR e TNF.
- b) Avaliar a expressão de PKR.

2) Avaliar o envolvimento de interferons do tipo I e fatores de transcrição Sp1 e NF- κ B na ativação transcricional de PKR em células THP-1 estimuladas com LPS e Pam3CSK4.

- a) Avaliar a abundância relativa dos mRNAs de IFN-beta e subtipos de IFN-alfa.
- b) Correlacionar a expressão de PKR e a fosforilação de STAT1.
- c) Determinar o efeito dos sobrenadantes obtidos de células THP-1 tratadas com LPS e Pam3CSK4 sobre a ativação do promotor de PKR e de ISG56, outro gene ativado por IFNs do tipo I.
- d) Determinar o efeito da ativação específica da via MyD88-dependente sobre a atividade do promotor de PKR em células HEK293T.
- e) Avaliar a ativação do promotor de E-selectina e IFN- β que possui sítios para IRF-3 nas células THP-1 tratadas com LPS.
- f) Avaliar a fosforilação de STAT1 em células THP-1 tratadas com poly-IC.
- g) Avaliar o efeito de inibidores dos fatores de transcrição Sp1 e NF- κ B sobre a expressão de PKR.

- 3) Avaliar a fosforilação de STAT1 em macrófagos diferenciados de monócitos humanos THP-1 estimulados com os agonistas inflamatórios dos receptores TLR2 e TLR4.
- 4) Examinar a contribuição *in vivo* de PKR, avaliando e comparando a sobrevivência de camundongos WT e PKR^{-/-} em modelo de sepse polimicrobiana.

4. Materiais e Métodos

4.1 – Células

As células THP-1 (número ATCC TIB-202) são provenientes do laboratório do Dr. Bryan R. G. Williams, Department of Cancer Biology, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA.

Para o seu cultivo, as células eram retiradas do estoque de nitrogênio líquido e imediatamente descongeladas em banho de água a 37°C. A suspensão celular era então plaqueada em um frasco estéril de cultura de células (TPP, 75 cm²) contendo meio RPMI-1640 (LGC-Brasil) suplementado com 10% SFB, 2mM L-glutamina (GIBCO) e antibióticos Penicilina G (100 U/mL, Gibco) e Estreptomicina (100 µg/mL, Gibco) e incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. Para a manutenção das células em cultivo, tão logo atingissem confluência de 80-90%, dois terços da suspensão celular eram desprezados e quantidade similar de meio RPMI-1640 suplementado era adicionado à cultura.

Para o congelamento, as células apresentando 90-100% de confluência eram centrifugadas a 200 x g por 7 minutos, sendo posteriormente ressuspensas em meio de congelamento contendo 90% SFB em meio RPMI. Isso resultou numa suspensão à qual foi adicionado DMSO (SIGMA) gelado, gota a gota e sob agitação leve e constante, para atingir concentração final 10%. Um mililitro e meio da suspensão foram distribuídos por tubo de congelamento (Corning), quando então foram transferidos para freezer a -70°C e, posteriormente, foram estocados em botijão de nitrogênio líquido a -196°C.

As células HEK293T (número ATCC CRL-11268) são linhagens imortalizadas de células epiteliais de rim de embrião humano contendo o antígeno T do vírus simian SV40 (HEK293T). Para o seu cultivo, essas células eram

retiradas do estoque de nitrogênio líquido e imediatamente descongeladas em banho de água a 37°C. A suspensão celular era então plaqueada em um frasco de cultura de células (TPP, 25cm²) contendo meio DMEM (Meio Eagle Modificado Dulbecco's-LGC-Brasil) suplementado com 10% SFB (GIBCO) e antibióticos Penicilina G (100U/mL, Gibco) e Estreptomicina (100µg/mL, GIBCO) e 4% de glicose, e incubada em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO². No dia seguinte, o meio era renovado com a finalidade de desprezar células não viáveis e que não se aderiram à superfície do frasco.

Ao atingirem 80-90% de confluência nos dias subsequentes, era realizada a passagem para outro frasco de cultura estéril (TPP, 75 cm²) para a manutenção. Para realizar as passagens, o meio de cultura era desprezado do frasco, e a monocamada de células era então lavada com PBS 1X (NaCl 140mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 1Mm; KCl 2 mM). Em seguida, eram adicionados 1 a 2 mL de solução de Tripsina (0,25%)-EDTA por frasco, o qual era então incubado a 37°C por 1 minutos. Posteriormente, as células eram ressuspensas em meio completo fresco e transferidas para novos frascos na razão desejada (1:5, 1:10 por exemplo).

Para o congelamento, as células apresentando 90-95% de confluência eram lavadas em PBS e tripsinizadas como descrito acima, sendo posteriormente ressuspensas em meio de congelamento contendo 90% SFB em DMEM. Isso resultou numa suspensão à qual foi adicionado DMSO (SIGMA), gota a gota e sob agitação leve e constante, para atingir concentração final 10%. Um mililitro e meio da suspensão foram distribuídos por tubo de congelamento (Corning), quando então foram transferidos para freezer a -70°C e, posteriormente, foram estocados em botijão de nitrogênio líquido a -196°C.

4.1.1 – Tratamento Celular

Para a realização dos estudos em monócitos THP-1, as células eram mantidas em garrafas de 75 cm² e então eram transferidas para tubos de 50 mL e centrifugadas a 200 x g durante 7 minutos a 4°C em centrífuga (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Scientific). O sobrenadante era descartado e o sedimento era resuspenso em 10 mL de meio RPMI1640 10%SFB e, posteriormente, as células eram contadas em câmara de Neubauer.

Todos os experimentos foram realizados em placas de 6 poços (TPP) com densidade de $1,5 \times 10^6$ células/mL. As células eram deixadas sem tratamento ou tratadas com Lipopolissacarídeo (LPS) O55:B5 (Sigma, USA) nas concentrações 1, 10, 100 e 1000ng/mL diluído em PBS 1X e com Pam3CSK4 (EMC Microcollections, Alemanha) diluído em meio DMEM nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 ng/mL, durante 18 horas. Também foram realizados experimentos de cinética nos tempos de 5, 15 e 30 minutos e 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas com as células THP-1 estimuladas ou não com LPS (1µg/mL) ou com Pam3CSK4 (100ng/mL) ou com 1000 U/mL IFN-A2 (Roferon A, Roche) ou com poly-IC (P-1530, Sigma) (100 µg/mL). As células THP-1 também foram tratadas com 25 µM de TPCK ou com BAY 11-7082 (Sigma) em diferentes concentrações, ambos inibidores de NF-κB, 20 minutos ou 30 minutos, respectivamente, antes dos tratamentos com os agonistas de TLR2/4 e com 1µM de Mitramicina-A (MiA – Sigma-Aldrich), um inibidor de Sp1, 30 minutos antes dos tratamentos com os agonistas de TLR2/4. Experimentos que visaram à obtenção do sobrenadante foram realizados em placas de 10cm² (TPP) por diferentes intervalos de tempo.

Células HEK293T foram transfectadas ou não com 3µg do plasmídeo MDA5 para controle da amplificação das seqüências de IFN-α e IFN-β em experimentos de PCR em tempo real através do método polímero catiônico descrito abaixo.

As células THP-1 e HEK293T também foram utilizadas em experimentos de transfecção para análise de genes repórteres pela atividade da luciferase conforme descrito abaixo.

4.1.2 – Viabilidade Celular

A fim de verificar a viabilidade das células THP-1 após 24 horas de tratamento com os agonistas TLR2/4; $1,5 \times 10^6$ células foram plaqueadas em placas de 12 poços e tratadas com LPS (1µg/mL) ou com Pam3CSK4 (100 ng/mL) em triplicata durante 24 horas. Em seguida o sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de 1,5 mL (Axygen Scientific), a monocamada foram adicionados 500 µL de PBS/EDTA por poço com auxílio de seguidas e suaves resuspensões as células aderidas pelo tratamento foram transferidas para os respectivos tubos. Realizou-se centrifugação 200 x g por 7 minutos (centrifuga 5424 Eppendorf), o sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspendido em 1 mL de meio completo. A contagem do número de célula foi realizada utilizando Azul de Tripán 0,2% (Sigma-Aldrich). O índice de viabilidade celular (IVC) foi dado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{IVC} = \frac{\text{DCV}}{\text{DCV} + \text{DCM}} \times 100 =$$

DCV = número total de células vivas

DCM= número total de células mortas

4.1.3 – Diferenciação Celular

Células da linhagem THP-1 mantidas em frascos de cultura de 75 cm² foram transferidas para tubos de 15 ml e centrifugadas a 200 x g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 10 ml de meio RPMI-1640 (LGC-Brasil) suplementado com 10% de SFB e antibióticos. Posteriormente as células foram contadas na câmara de Neubauer. Foram preparadas placas de 6 poços com a densidade de 1,5 X 10⁶ células/mL. As células foram tratadas ou não com Parabol 12-Miristato13-Acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) (100 mM) durante 72 horas. Em seguida, as células foram tratadas com os agonistas de TLR2/4 em diferentes intervalos de tempo.

4.2 - Detecção dos níveis de expressão do RNA mensageiro (mRNA)

4.2.1 - Extração do RNA total

Células THP-1 estimuladas conforme descrito no item acima que eram destinadas ao experimento de qRT-PCR foram transferidas para tubos de 15mL (TPP) e centrifugadas a 200 x g por 7 minutos. Paralelamente, 1 mL de Trizol (Invitrogen) era adicionado em cada poço, de modo que o RNA total fosse obtido também de células que pudessem ter aderido em decorrência da estimulação. Ao

término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o Trizol de cada poço era transferido para os tubos correspondentes. O sedimento era então ressuspensionado. O homogenato obtido era transferido para tubos de microcentrífuga 1,5 mL (Axygen Scientific) autoclavados e então incubado por 5 minutos à temperatura ambiente.

Logo em seguida eram adicionados em todas as amostras 0,2 mL de Clorofórmio (VETEC, Brasil) ao homogenato seguido de inversão vigorosa e incubação à temperatura ambiente durante 3 minutos. Em seguida, as amostras eram centrifugadas a 13.000 x g durante 15 minutos, obtendo-se ao final uma fase aquosa (superior) e uma fase orgânica (inferior). A fase aquosa era transferida para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL onde eram adicionados 0,5 mL de álcool isopropílico (Proquímicos, Brasil) e nova inversão era realizada delicadamente. As amostras eram incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugadas a 13.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante era descartado e o sedimento era lavado com 1 mL de etanol 75% por agitação em vortex. A mistura era então centrifugada a 9.000 x g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante era descartado e o RNA dissolvido em 35 µL de água tratada com DEPC (Invitrogen). Em seguida, a amostra era incubada a 60°C durante 15 minutos e posteriormente estocada a -20°C. Para a quantificação do RNA foram utilizados dois microlitros de cada amostra para leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (Nanodrop, ThermoScientific, USA) em comprimentos de ondas de 260 e 280 nm. Obtidas as absorbâncias de 260 nm, a quantidade de RNA era calculada em µg/µL.

4.2.2 - Obtenção da fita simples de cDNA

Um micrograma de RNA total de cada amostra era misturado a 0,5 µg de oligo-dT₁₅ diluído em água DEPC. A solução era incubada a 70°C durante 5 minutos, seguido de incubação no gelo durante 2 minutos. Posteriormente, eram adicionados uma mistura de dNTPs (dATP; dCTP; dGTP; dTTP) 10 mM (Promega), solução tampão 5X da enzima MMLV (Promega) e 200U da enzima MMLV-RT (Promega) em volume final de 20 µl por reação, seguido de incubação a 42°C durante 1 hora. Para inativação da enzima transcriptase reversa MMLV, a solução era posteriormente incubada a 70°C durante 15 minutos. Em seguida as amostras eram armazenadas em freezer -20°C.

4.2.3 - Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) – SYBR-Green

Oito microlitros de uma diluição 1:10 (em água) da reação da primeira fita de cDNA eram adicionados 2,5 µL de uma solução contendo tampão 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100; 20mM MgCl₂) da enzima Taq DNA-polimerase, 0,5 µL de dNTPs (dATP; dCTP; dGTP; dTTP - Promega) 10 mM e 0,25 µL de SYBR-Green (1:1000 em DMSO), 20 picomoles dos iniciadores (1,25 µL de cada) e 0,2 U/µL da enzima Taq DNA-polimerase (Phoneutria) (0,125 µL) em um volume final de 25µL e então submetidos a seguintes condições termo-cíclicas: 95°C/5 minutos; 40 ciclos a 95°C/20 segundos, 60°C/30 segundos, 72°C/30segundos; 95°C/1minuto em termociclador 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems, USA). O método comparativo Ct foi aplicado aos

dados obtidos pela PCR em tempo real (Livak e Schmittgen 2001) e os valores eram normalizados utilizando os valores de Ct obtidos para GAPDH.

Nessas reações eram utilizados os seguintes iniciadores:

Iniciadores	Sequencias
huPKR Fwd	5'-GAATGGTCTAGAAAATAATCAAAG-3'
huPKR Rev	5'-CTCAAGAGAAATTCATCACTGGTC-3'
huTNF Fwd	5'-CGCCACCACGCTCTTCTGC-3'
huTNF Rev	5'-ACGGCGATGCGGCTGATG-3'
huIFN- α Fwd*	5'-TTTCTCCTGCCTGAAGGACAG-3'
huIFN- α Rev*	5'-GCTCATGATTTCTGCTCTGAC-3'
huIFN- β Fwd	5'-CATTACCTGAAGGCCAAGGA-3'
huIFN- β Rev	5'-CAATTGTCCAGTCCCAGAGG-3'
huGAPDH Fwd	5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3'
huGAPDH Rev	5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'

* (Zhang et al., 2005)

4.3 - Western-blot

4.3.1 - Obtenção de extratos celulares

Em seguida aos estímulos, as amostras de células THP-1 ou THP-1 diferenciadas com PMA destinadas ao experimento de Western Blot, eram transferidas para tubos de 15 mL contendo 10 mL de PBS 1X gelado e centrifugadas a 200 x g por 7 minutos. Aos poços eram adicionados 150 μ L a 200 μ L de tampão de lise de proteínas (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; NaF

50mM; beta-Glicerofosfato 10mM; EDTA 0,1 mM pH 8,0; Glicerol 10%; Triton X-100 1%) contendo inibidores de proteases [PMSF (1 mM); Ortovanadato de sódio (1 mM); Pepstatina (2 mg/mL); Aprotinina (2 mg/mL)); Leupeptina (2 mg/mL)] e as células que pudessem estar aderidas devido ao estímulo eram recuperadas com o auxílio de raspador de células (Nunc, Cell scraper). Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o tampão de lise adicionado em cada poço era transferido para os tubos correspondentes. Posteriormente foi realizada centrifugação a 8.000 x g. por 10 minutos (centrifuga 5424 Eppendorf). As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

4.3.2 - Quantificação dos extratos celulares (Bradford, 1976)

Alíquotas dos extratos celulares eram transferidas para placas de microtitulação de 96 poços e diluídas sucessivamente em água Milli-Q em razões extrato/água de 1:5 e 1:10, obtendo-se um volume final de 10 µL em por poço. Posteriormente, eram adicionados 190 µL do reagente Bradford (BioRad) por poço. A absorbância era obtida em leitor de ELISA (Molecular Devices/Spectra Max Plus) utilizando-se filtro de 595nm. A concentração em µg/µL das amostras e a curva padrão BSA eram obtidas através do programa SoftMax-Pro.

4.3.3 - Fracionamento eletroforético e transferência (Laemmli et al., 1974; Towbin et al., 1979)

Tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 contendo SDS 0,4%; Glicerol 30%; SDS 10%; b-Mercaptoetanol 6%; Azul de bromofenol 1,2%) era misturado a 30 ou 50 µg dos extratos celulares obtidos de células. Em seguida à fervura por 3

minutos, os extratos eram submetidos à SDS-PAGE 10 a 14%, a uma tensão de 140 volts em tampão Tris-Glicina (Tris base 25 mM pH 8,3; Glicina 250 mM; SDS 0,1%). Em seguida, as proteínas fracionadas foram transferidas para membrana de PVDF-Hybond-P (Amersham Biosciences) em tampão de transferência (Tris base 25mM pH 8,0; Glicina 250mM; Metanol 20%) a 100 volts por 1 hora.

Em seguida, as membranas eram lavadas em TBS/T (Tris-HCl 20 mM pH 7,6; NaCl 137 mM; Tween 20 0,1%) por 5 minutos e bloqueadas com solução de bloqueio (TBS/T + 5% (p/v) de leite em pó desnatado) por 1 hora sob agitação em homogeneizador (Hemoquímica MOD.HM1003). Em seguida, as membranas foram lavadas em TBS/T por 3 vezes por 5 minutos cada. Subsequentemente, as membranas eram incubadas a 4°C, sob agitação, com anticorpos específicos: anti-PKR (BC-1) diluído em solução de bloqueio 5%, que foram cedidos pelo Dr. Bryan R. G. Williams, (Monash Institute of Medical Research, Australia) e anti-fosfo-IkBa (Ser32/36), anti-fosfo-eIF2 α (Ser51) anti-fosfo-p38, anti-fosfo-STAT1 (Tyr 701) (Cell Signaling), diluídos em TBS/T + 5% de BSA e STAT1 e Mcl-1 (Santa Cruz Biotechnology) diluído em solução de bloqueio 2,5%.

Em seguida, as membranas eram novamente lavadas 3 vezes em TBS/T por 5 minutos cada lavagem e posteriormente incubadas com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Sigma) diluído em solução de bloqueio.

As membranas eram lavadas três vezes em TBS/T por 5 minutos com. O excesso deste tampão era retirado das membranas e era então adicionado 1 mL da solução de ECL-PLUS A e B (40:1) (Amersham Biosciences) por membrana. Filmes (Kodak) eram sensibilizados por estas membranas e estes eram revelados e fixados com solução reveladora e fixadora (Kodak).

Para reutilização das membranas, essas eram lavadas com TBS/T e incubadas overnight a 4°C, sob agitação, com anticorpo anti-actina (C-2): sc-8432 Santa Cruz Biotecnologia diluído em solução de bloqueio.

Em seguida este procedimento, as membranas eram novamente lavadas em TBS/T por 3 vezes de 5 minutos e posteriormente incubadas com anticorpo secundário murino IgG-HRP conjugado (Sigma) diluído em solução de bloqueio.

As membranas eram lavadas por 3 vezes de 5 minutos com TBS/T. O excesso deste tampão foi retirado das membranas e foi adicionado 1mL por membrana da solução de ECL-PLUS A e B (40:1) (Amersham Biosciences). Filmes (Kodak) foram sensibilizados por estas membranas e estes foram revelados e fixados com solução reveladora e fixadora (Kodak).

4.4 - Transfecção

4.4.1 - Em células HEK293T

No dia anterior à transfecção, células HEK293T, apresentando 90 a 100% de confluência, crescendo em garrafas de cultura de 75 cm² de área, eram lavadas em PBS 1X, tripsinizadas e plaqueadas na concentração de 2,5 x10⁵ células/poço em placa de 24 poços de modo a obter confluência em torno de 85-90% no momento da transfecção. Antes de iniciar o procedimento, o meio dos poços era substituído por 500 ul de meio completo fresco (10% SFB-DMEM). O protocolo para transfecção era realizado da seguinte maneira: em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL a quantidade desejada de DNA era misturada a 100 µL de meio DMEM sem de soro (SFM, *serum-free medium*). Em seguida, era adicionado à mistura o reagente de transfecção PEI na razão 5microlitros do

reagente para 1 micrograma de DNA seguido de agitação vigorosa em vortex durante 10 segundos. A mistura era incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, eram adicionados à mistura 200 µL de meio completo (10% SFB-DMEM). A solução era misturada gentilmente seguida de breve centrifugação. Em seguida, era adicionada o complexo de transfecção PEI:DNA sobre as células, gotejando por toda a extensão do poço, sendo inclinada a placa por algumas vezes para distribuição homogênea da solução transfectante. A placa era então incubada em estufa a 37°C, 5% CO₂, por 24 horas.

Em nossos estudos, as transfecções em células HEK293T foram conduzidas com quantidade final de 0,5 µg de DNA plasmideano por poço em placa de 24 poços. Os seguintes plasmídeos foram utilizados: pGL3-E-Sel que contém o gene repórter da luciferase de vagalume sob controle do promotor do gene E-Selectina, que é responsivo ao NF-κB; pGL2-561 que contém o gene repórter da luciferase de vagalume sob controle do promotor do gene de ISG56 humano (Bandyopadhyay et al., 1995); ou pGL2-p503(WT)LUC cujo gene repórter da luciferase de vagalume encontra-se sob controle de um segmento de 503-pb relativo ao promotor de PKR humano (Das et al., 2006). Para a normalização dos resultados, as células eram co-transfectadas com 0,1 µg do plasmídeo pRL-TK que contém o gene da luciferase de *Renilla* sob o controle do promotor da timidina cinase do vírus HSV-1. Vinte e quatro horas após a transfecção, o meio de cultura das células era desprezado, e então eram adicionados os sobrenadantes das células THP-1 previamente tratadas ou não com LPS (1µg/mL) e Pam3CSK4 (100 ng/mL). Como controle positivo utilizado nas transfecções, alguns poços de células transfectadas com pGL3-E-Sel eram tratadas com TNF (10 ng/mL). Da mesma maneira, alguns poços de células

transfectadas com pGL2-p503(WT)LUC ou com pGL2-561 eram tratadas com IFN-A2 (1000 U/mL) durante 18 horas, o mesmo tempo que as células ficaram em contato com os sobrenadantes provenientes das células THP-1. O meio era desprezado e o extrato celular era obtido ao adicionar 100µl de Tampão de Lise Passivo 1X fornecido pelo Kit Dual-Luciferase Reporter assay (Promega), A placa era colocada sob agitação à temperatura ambiente por 15 minutos, e ao abrigo da luz.

Em alguns experimentos, as células HEK293T também foram transfectadas com os genes repórteres conforme descrito acima, exceto que as células foram co-transfectadas com os plasmídeos pFLAG-Mal/TIRAP para ativação permanente de NF-κB ou pEF-BOS (vetor controle). As células foram deixadas sem tratamento ou tratadas com IFN-A2 (1000 U/mL) por 18 horas. Ao final do experimento, o meio era desprezado e o extrato celular era obtido ao adicionar 100µl de Tampão de Lise Passivo 1X sob agitação a temperatura ambiente por 15 minutos, e ao abrigo da luz.

Em outro experimento as células HEK293T foram transfectadas com o plasmídeo contendo a região promotora de MDA5, para controle dos experimentos de PCR em tempo real com os iniciadores para IFN-beta e subtipos de IFN-alfa, seguindo os mesmos procedimentos descritos acima.

4.4.2 – Em células THP-1

No dia anterior à transfecção, células THP-1 crescendo em garrafas de cultura de 75 cm² de área eram transferidas para tubos cônicos de 50 ml e então centrifugadas a 200 x g por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas, contadas e plaqueadas a uma densidade de 2x10⁵ células/poço

em placas de 24 poços. No dia seguinte ao plaqueamento, as transfecções eram realizadas utilizando o meio RPMI sem soro na presença de Lipofectamina (Invitrogen) e acrescentado de 0,4 µg dos plasmídeos pGL3-E-Sel ou pGL3-IFN-beta. Para a normalização dos resultados, as células eram co-transfectadas com 0,1 µg do plasmídeo pRL-TK que contém o gene da luciferase de *Renilla* sob o controle do promotor da timidina cinase do vírus HSV-1. Para cada 1 µg de DNA eram utilizados 3 µl de Lipofectamina. O DNA era diluído em 50 µL de meio RPMI e a solução era misturada gentilmente. Em seguida, era feita a diluição da Lipofectamina em 50 µL de meio RPMI e incubava-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o tempo de incubação, combinava-se o DNA ao meio contendo Lipofectamina (totalizando 100 µL), seguido por incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o volume de 100 µL do complexo DNA/Lipofectamina era distribuído por toda a extensão do poço, sendo inclinada a placa por algumas vezes para distribuição homogênea da solução transfectante. As células eram incubadas com o meio de transfecção por aproximadamente 24 horas a 37°C, em estufa 5% CO₂. As células foram tratadas com LPS (1 µg/mL) em diferentes intervalos de tempo. Ao final do experimento, as células eram transferidas para tubos de microcentrífuga e centrifugadas a 200 x g durante 8 minutos. Paralelamente, ressuspensas 100µl de Tampão de Lise Passivo 1X eram adicionados aos respectivos poços para a lise de células que pudessem estar aderidas. A placa era colocada em homogeneizador e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. Posteriormente, o tampão de lise era transferido dos poços para os tubos de microcentrífuga para a ressuspensão do sedimento celular.

4.5 - Ensaio de gene repórter através da determinação da atividade da luciferase

O ensaio de gene repórter é amplamente utilizado em estudos de ativação gênica. Através desse método é possível avaliar as atividades específicas de elementos regulatórios presentes em regiões gênicas promotoras, através de uma proteína “repórter” que seja facilmente detectada, e quantificada, porém distinta das proteínas celulares endógenas. Normalmente, emprega-se uma enzima “repórter” para o estudo do promotor, ou seja, a região gênica promotora é clonada acima da sequência codificadora da proteína repórter. A quantidade de proteína expressa, associada à sua atividade enzimática, permite determinar a atividade da região promotora. Dentre os genes repórteres mais estudados está a luciferase.

Os extratos celulares obtidos dos estudos de transfecção com genes repórteres em células THP-1 e HEK293T eram analisados pelo ensaio de atividade da luciferase conforme recomendações do fabricante (Sistema Dual Luciferase Assay da Promega).

As amostras eram descongeladas em banho de gelo e ao abrigo da luz. O lisado era homogeneizado com auxílio de uma pipeta e transferido para tubos de 1,5 mL (Axygen) e centrifugado a 8.000 x g por 5 minutos. Para medir a atividade da luciferase dos genes repórteres, 5 µl ou 20 µl de extrato celular obtido das células HEK293T e THP-1, respectivamente, eram transferidos para poços em placa branca de 96 poços (Fluoronunc, EUA), seguido da adição de 40µl do reagente Luciferase Assay Reagent II (LAR II) – substrato da luciferase de vaga-lume – antes da leitura. A captura da luminescência produzida em cada extrato era feita por 3 segundos em luminômetro (Lumicount, Packard, EUA). Em

seguida, eram adicionados 40µl do reagente Stop & Glo– substrato da luciferase de *Renilla* – quando então realizava-se nova leitura. A razão entre a atividade da luciferase de vagalume sobre a atividade da luciferase de *Renilla* fornece a atividade relativa da luciferase.

4.6 - Análise estatística

Para análises estatísticas foi utilizado teste T de student com pós-teste paired test. Os gráficos e estatísticas foram feitas com auxílio do *software* Graphpad Prism 5. Para análises densitométricas dos resultados obtidos nos experimentos de Western Blot foi utilizado o *software* ImageQuant.

Estudos *in vivo*

Esta parte do estudo foi conduzida em colaboração com os Professores Mauro M. Teixeira (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG), Daniele da Glória de Souza (Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG), Cristiano Xavier Lima (Faculdade de Medicina) e Flávio Almeida Amaral (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG).

Relatório aprovado pelo CETEA: 002/11.

4.7 - Modelo experimental de sepse polimicrobiana (CLP)

Os animais utilizados nesse experimento eram da linhagem 129 SvEv e eram mantidos no biotério do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ, que possui status sanitário convencional controlado; controle ambiental de temperatura, variando entre 18 e 22 graus e com controle de fotoperíodo de 12 horas claro, 12 horas escuro. Os animais nessa instituição são avaliados trimestramente para parasitas e anualmente para vírus e bactérias.

Para o procedimento operatório camundongos 129 SvEv selvagens machos (WT) e 10 deficientes de PKR machos (PKR -/-) foram anestesiados por aplicação intraperitoneal de 100 µL de solução contendo de cloridrato de xilasina (10 mg/kg) e cloridrato de quetamina (50 mg/kg) diluídos em solução de NaCl 0,9%. Sob técnicas assépticas, foi realizada laparotomia paramediana esquerda. O ceco foi exposto e submetido à ligadura frouxa (permitindo o fluxo vascular e impedindo o trânsito intestinal) distal à junção ileocecal com fio de seda 5-0. O ceco foi submetido a duas perfurações com agulha 16 G e leve compressão que permitia o extravasamento de conteúdo fecal. O ceco foi reintroduzido na cavidade peritoneal e realizada laparorrafia com fio de náilon 5-0 (Hubbard et al., 2005). Ao despertarem, os animais foram acondicionados em gaiolas com livre acesso a água e ração e foram mantidos em condições de temperatura e fotoperíodo controlados conforme descrito acima.

5 - Resultados

5.1 – O tratamento de promonócitos humanos com agonistas TLR4 e TLR2 resulta em aumento nos níveis de mRNA e protéico de PKR.

Diversos estudos têm relacionado à atividade de PKR em algumas linhagens celulares como macrófagos quando essas são estimuladas com bactérias ou produtos bacterianos que são reconhecidos por TLRs (Hsu et al., 2004; Cheung et al., 2005; Cabaski et al., 2007).

Entretanto, não existem até o momento relatos na literatura que abordem o perfil de expressão de PKR em promonócitos humanos, THP-1, estimulados com agonistas LPS e Pam3CSK4.

Assim, primeiramente foram avaliados os níveis de expressão do mRNA de PKR assim como seus os níveis protéicos nas células THP-1. Então essas células foram tratadas com concentrações crescentes de LPS (1, 10, 100 e 1000 ng/mL) e de Pam3CSK4 (1, 10, 50 e 100 ng/mL) durante 18 horas. Ao final dos tratamentos, o RNA total foi obtido e posteriormente utilizado para a obtenção da primeira fita de DNA complementar (cDNA), que foi utilizada nos experimentos de PCR em tempo real. Nas mesmas condições de tratamento com os agonistas TLRs, os extratos celulares totais foram obtidos para os ensaios de western-blot.

Através dos resultados obtidos foi possível observar que ocorre aumento dos níveis do mRNA de PKR de modo dose dependente e que as maiores doses dos agonistas utilizadas nos tratamentos levaram a um aumento significativo dos níveis protéicos de PKR. Ainda, é possível notar a fosforização de I κ B α que, quando fosforilado, sofre ubiquitinação para ser degradado pelo proteossoma, permitindo assim a translocação de NF- κ B para o núcleo, onde se liga a regiões promotoras de diversos genes (O`Dea e Hoffmann 2009) (Figura 3 A e B). O

aumento dos níveis proteicos de PKR neste ensaio foi confirmado por análise densitométrica (Figura 4). A partir desses resultados, as maiores doses (LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e Pam3CSK4 100 ng/mL) foram escolhidas para os estudos subsequentes.

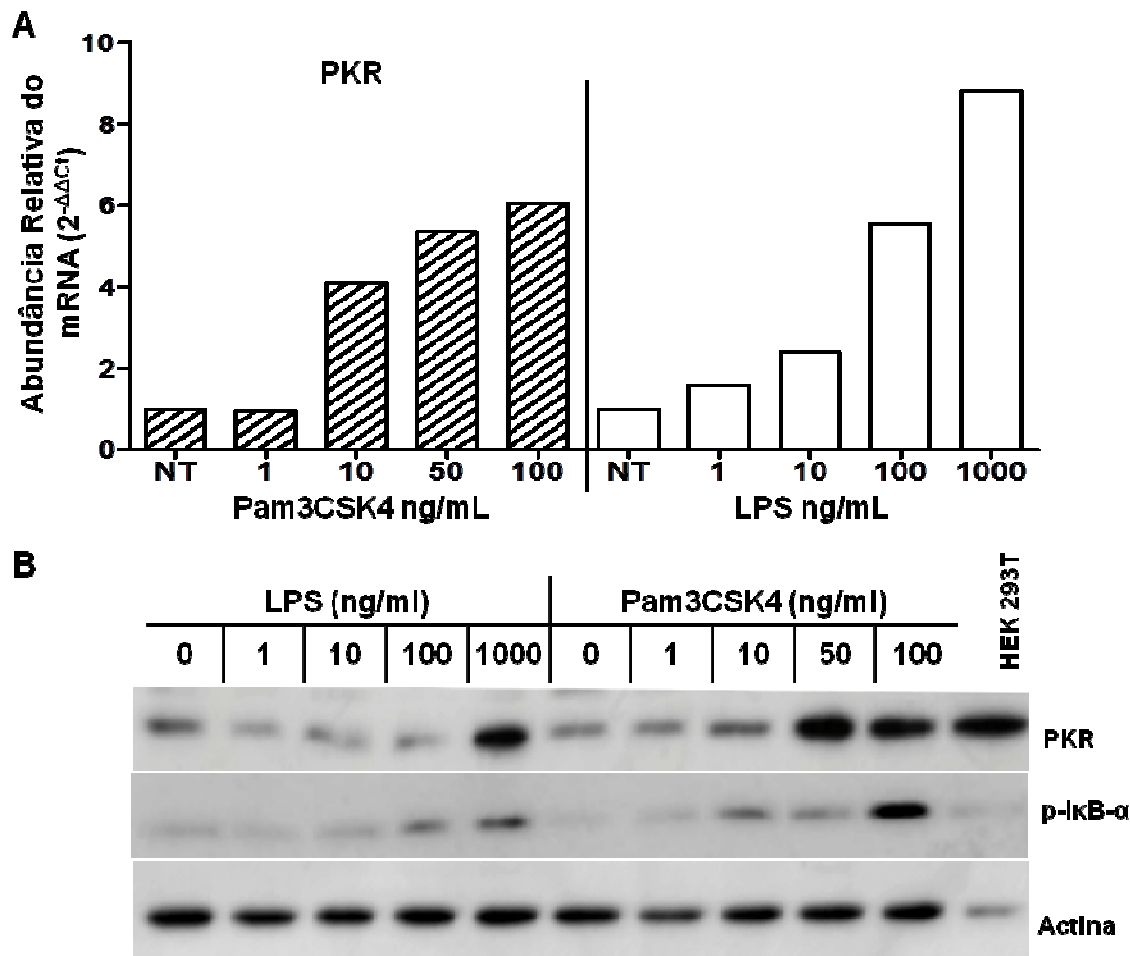


Figura 3 - (A) Abundância relativa do mRNA de PKR em células THP-1 tratadas com os agonistas dos receptores TLR2 e TLR4. Células THP-1 foram deixadas sem tratamento (NT) ou estimuladas durante 18 horas com LPS e Pam3CSK4 em concentrações crescentes, conforme indicado. O cDNA obtido a partir do RNA total de cada amostra foi diluído 1:10 e submetido à reação de PCR em tempo real com os iniciadores para PKR. **(B) Análise por western-blot dos níveis de PKR em células THP-1 tratadas com agonistas de TLR2 e TLR4.** Células THP-1 foram deixadas sem tratamento (0) ou estimuladas durante 18 horas com LPS e Pam3CSK4 em concentrações crescentes, conforme indicado. Vinte microgramas dos extratos celulares obtidos ao final dos tratamentos foram submetidos a 14% SDS-PAGE, transferidos para membranas de PVDF e analisados com anticorpos anti-PKR, anti-fosfo-IkBα e anti-actina. Extratos obtidos de células HEK293T foram fracionados para comparação.

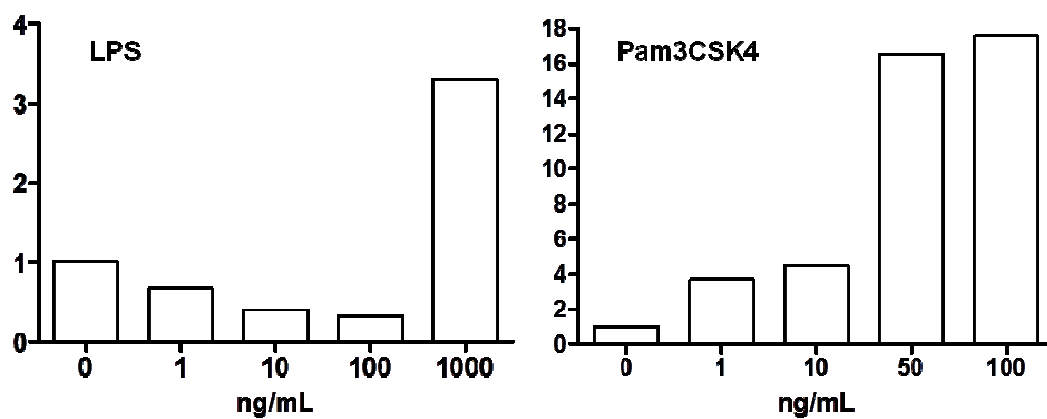


Figura 4 - Análise densitométrica dos níveis de PKR mostrados no western-blot da figura 3B. Os dados são expressos em valores arbitrários.

Em seguida, foram realizados estudos de cinética nos tempos de 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas. Como é possível observar na figura 5 A, os níveis dos transcritos do mRNA de PKR aumentam a partir de 3 horas de estímulo com ambos agonistas, e esse aumento é observado ao longo do tempo. No entanto, nota-se uma diminuição dos transcritos em 24 horas no tratamento com Pam3CSK4. Já nos estudos de western-blot, o aumento dos níveis protéicos pode ser observado a partir de 6 horas no tratamento com LPS e 12 horas no tratamento com Pam3CSK4. A fosforilação de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ precede o aumento dos níveis protéicos de PKR (Figura 5 B). O aumento dos níveis de PKR foi confirmado através de análise densitométrica (Figura 6).

A fim de demonstrar a ativação efetiva das vias de sinalização desencadeadas pelos agonistas de TLR2 e TLR4, nós também analisamos os níveis do mRNA de TNF e a fosforilação de p38 MAPK, que são eventos chaves ativados pela estimulação por TLR2 e TLR4 (Takeda et al., 2003). Como esperado, foi observado um aumento significativo dos níveis do mRNA de TNF (Figura 7) logo nos tempos iniciais de tratamento para ambos agonistas. Também observamos níveis elevados de fosforilação de p38 MAPK uma hora após os tratamentos e decaindo ao longo do tempo de 3, 6, 12 e 24 horas (dado não mostrado).

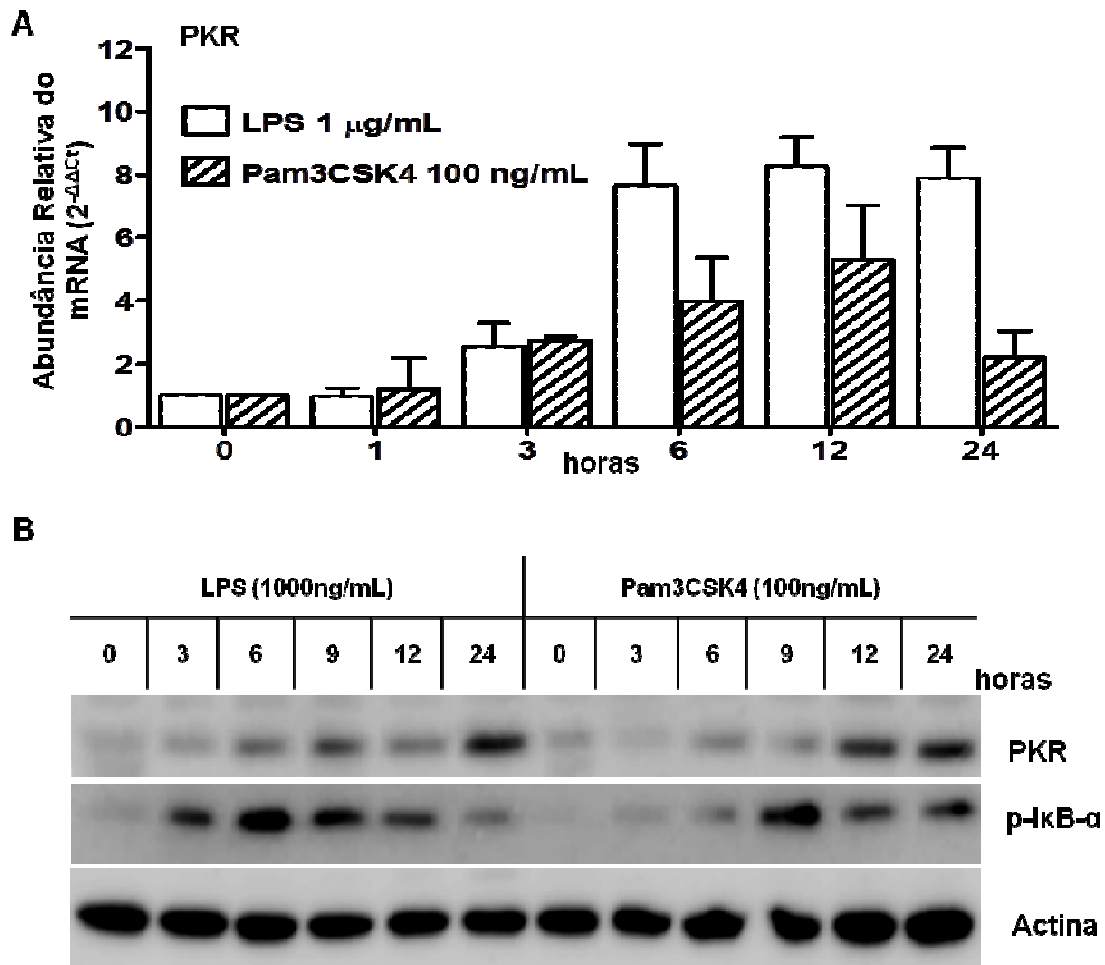


Figura 5 - (A) Abundância relativa do mRNA de PKR em células THP-1 tratadas com agonistas dos receptores TLR2 e TLR4 ao longo do tempo. Células THP-1 foram deixadas sem tratamento (0) ou estimuladas com LPS (1000 ng/mL) e Pam3CSK4 (100 ng/mL) nos tempos indicados na figura. A partir do RNA total de cada amostra foi obtida a primeira fita de cDNA que foi diluída 1:10 e submetida a reação de PCR em tempo real com os iniciadores para PKR. **(B) Análise por western-blot da cinética dos níveis de PKR em células THP-1 tratadas com agonistas de TLR2 e TLR4.** As células foram deixadas sem tratamento (0) ou estimuladas conforme indicado na figura. Vinte microgramas dos extratos celulares obtidos ao final dos tratamentos foram fracionados em gel de poliacrilamida 14% (SDS-PAGE), transferidos para membrana PVDF e analisados com anticorpos específicos como indicado na figura.

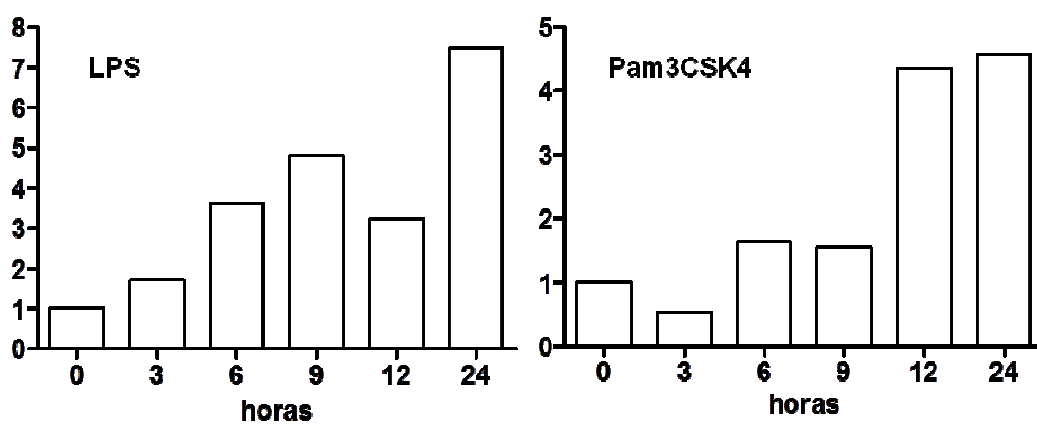


Figura 6 - Análise densitométrica dos níveis de PKR mostrados no western-blot da figura 5B. Os dados são expressos em valores arbitrários.

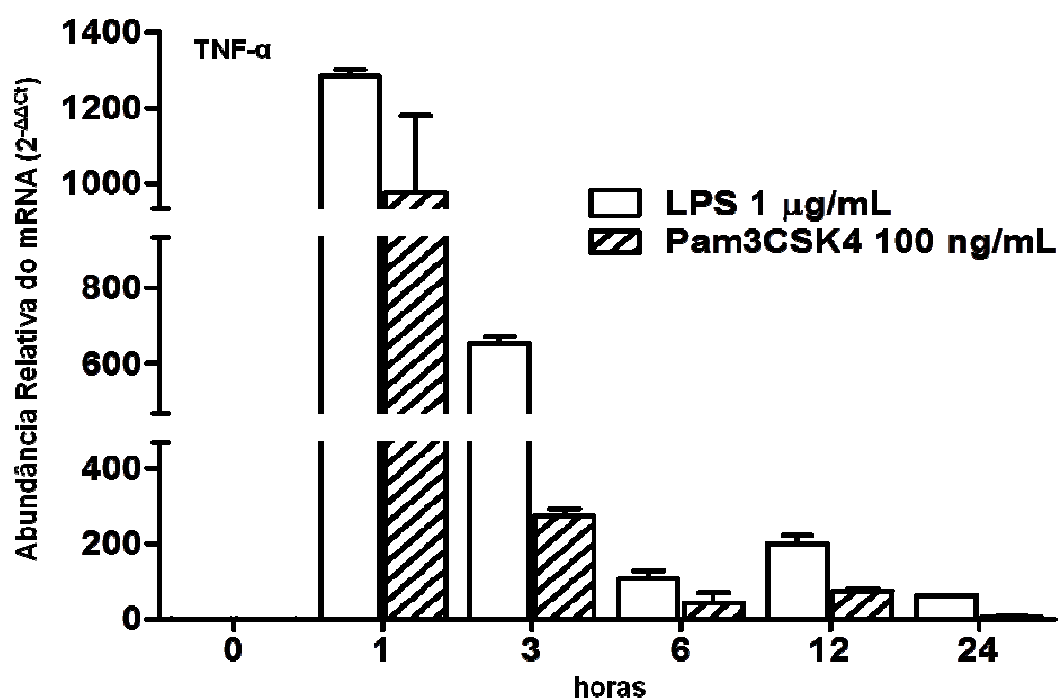


Figura 7 – Abundância relativa do mRNA de TNF em células THP-1 tratadas com os agonistas dos receptores TLR2 e TLR4. Células THP-1 foram deixadas sem tratamento (0) ou estimuladas com LPS (1000 ng/mL) e Pam3CSK4 (100 ng/mL) nos tempos indicados na figura. A partir do RNA total de cada amostra foi obtida a primeira fita de cDNA que foi diluída e submetida a reação de PCR em tempo real com os iniciadores para TNF.

Após obtenção dos resultados acima questionamos se as células THP-1 permaneciam viáveis e se expressariam proteínas relacionadas com a sobrevivência celular, como Mcl-1, durante 24 horas de tratamento com os agonistas TLR2 e TLR4. Assim, como controle para realização dos próximos experimentos, examinamos a viabilidade das células THP-1 após 24 horas de tratamento com LPS e Pam3CSK4 nas maiores doses que foram utilizadas nos experimentos de dose resposta (1 µg/mL e 100 ng/mL respectivamente).

Células THP-1 foram então tratadas com LPS (1 µg/mL) e Pam3CSK4 (100 ng/mL) durante 24 horas. Ao final desse tempo, as células obtidas foram ressuspensas com 1mL de meio RPMI e posteriormente diluídas em meio RPMI contendo 0,2% de Azul de Tripán e contadas em câmara de Neubauer (Figura 8 A). O resultado mostra que as células THP-1 não sofrem perda da viabilidade após os tratamentos.

Também examinamos os níveis de expressão da proteína anti-apoptótica Mcl-1 em células THP-1 tratadas com as mesmas concentrações e no mesmo tempo do experimento anterior em duplicata. Na figura 8 B, notamos um discreto aumento dessa proteína após tratamento com os agonistas quando comparados com a amostra controle deixada sem tratamento.

Mcl-1 (Myeloid cell leukemia 1) é uma proteína da família Bcl-2 que pode atuar como uma molécula *upstream* no controle da apoptose, promovendo a sobrevivência da célula através da interferência numa fase precoce da cascata de eventos que conduzem à liberação de citocromo c nas mitocôndrias (Michels et al., 2005).

Esses resultados demonstram portanto que o tratamento com LPS e Pam3CSK4 ao longo de 24 horas não acarreta em perda da viabilidade e da sobrevivência das células THP-1.

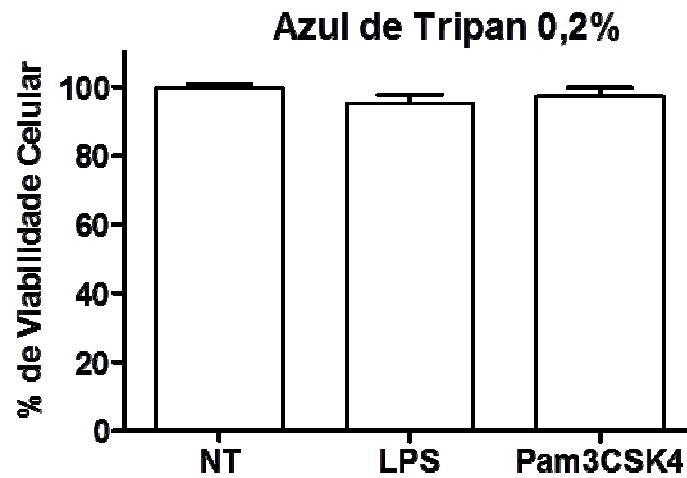
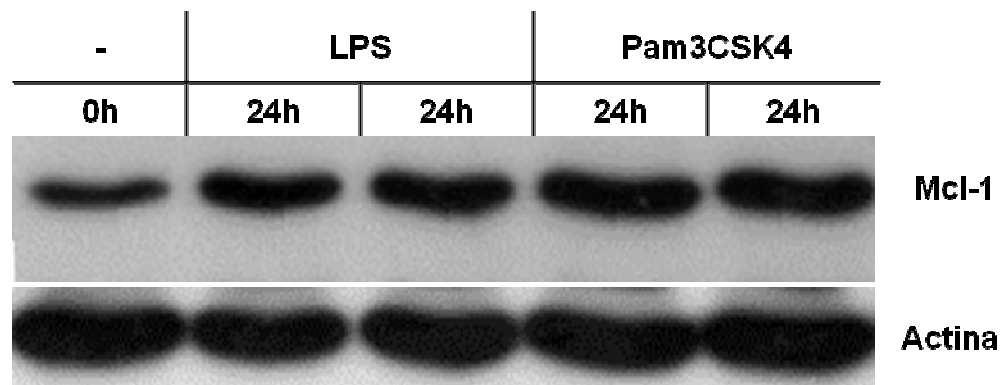
A**B**

Figura 8 -- Análise da viabilidade celular das células THP-1 em decorrência do tratamento com agonistas dos receptores TLR2 e TLR4. (A) Seguindo tratamento das células THP-1 com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou com Pam3CSK4 (100 ng/mL) em triplicata durante 24 horas, células THP-1 foram ressuspensas em solução contendo Azul de tripan 0,2% e em seguida contadas em câmara de Neubauer. Os tratamentos foram conduzidos em triplicata. A viabilidade celular foi determinada em porcentagem ao calcular o número total de células viáveis dividido pela soma do número total de células viáveis mais o número total de células mortas, multiplicado por cem. **(B)** Células THP-1 foram tratadas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou Pam3CSK4 (100 ng/mL) em duplicata durante 24 horas. Trinta microgramas dos extratos celulares obtidos ao final dos tratamentos foram submetidos a 14% SDS-PAGE, transferidos para membranas de PVDF e analisados com anticorpo Mcl-1. O anticorpo anti-actina foi utilizado para demonstrar as quantidades equivalentes de extrato aplicadas por canaleta.

5.2 – O aumento da expressão de PKR em células THP-1 tratadas com agonistas de TLR2 e TLR4 ocorre na ausência de transcrição e síntese de IFNs do tipo I

Estudos mostram que o aumento da expressão de PKR em macrófagos tratados com agonistas de TLR2 e TLR4 está relacionado com a síntese de IFNs do tipo I (Hsu et al., 2004; Dietrich et al., 2010). Para verificar a participação de IFNs do tipo I no aumento da expressão de PKR em células THP-1 tratadas com LPS e Pam3CSK4, nós conduzimos estudos por PCR em tempo real para análise da abundância relativa do mRNA de IFN-beta e dos subtipos de IFN-alfa. Esses experimentos foram realizados com amostras obtidas de células HEK293T transfectadas ou não com plasmídeos contendo a região promotora de MDA5, como controle positivo da reação uma vez que esses levam a uma produção significativa de IFN-I (Meylan e Tschopp 2006).

Os resultados obtidos demonstraram que não ocorre aumento dos níveis do mRNA de IFN- β nem mesmo de IFN- α , como pode ser observado na figura 9. Para fornecer evidência direta que os transcritos dos mRNAs de IFNs analisados são eficientemente amplificados, amostras de cDNAs obtidos por transcrição reversa dos RNAs de células HEK293T que foram transfectadas ou não com MDA5 – um receptor RLR que ativa a transcrição de IFN-beta – foram utilizadas concomitantemente nos estudos de qRT-PCR. De fato, os resultados (gráfico menor inserido, Figura 9) demonstram amplificação eficiente dos IFNs do tipo I.

Esse resultado nos levou a formular duas hipóteses. Uma é de que a ativação transcricional de IFNs do tipo I em células THP-1 ocorreria de forma transiente em resposta à estimulação com os agonistas de TLR2 e TLR4, e que seria tecnicamente limitada a sua análise pela PCR em tempo real. A

segunda hipótese é que o aumento da expressão de PKR induzido pela ativação de TLR2 e TLR4 nas células THP-1 é regulado por um mecanismo que não envolve a síntese de IFNs do tipo I, e que poderia ser testada ao analisar a presença ou a atividade de IFNs do tipo I nos sobrenadantes das células tratadas com os agonistas.

Portanto, nós realizamos experimentos em que os sobrenadantes das células THP-1 tratadas ou não por 6 e 24 horas com LPS e Pam3CSK4 foram coletados para posterior tratamento de células HEK293T transfectadas com plasmídeos de genes repórteres contendo região promotora de ISGs, sobretudo PKR. Assim, mesmo havendo a ativação transcricional transiente de IFNs do tipo I, esses transcritos seriam traduzidos e os IFNs secretados no meio extracelular ao serem adicionados às células HEK293T levariam à ativação de promotores de ISGs.

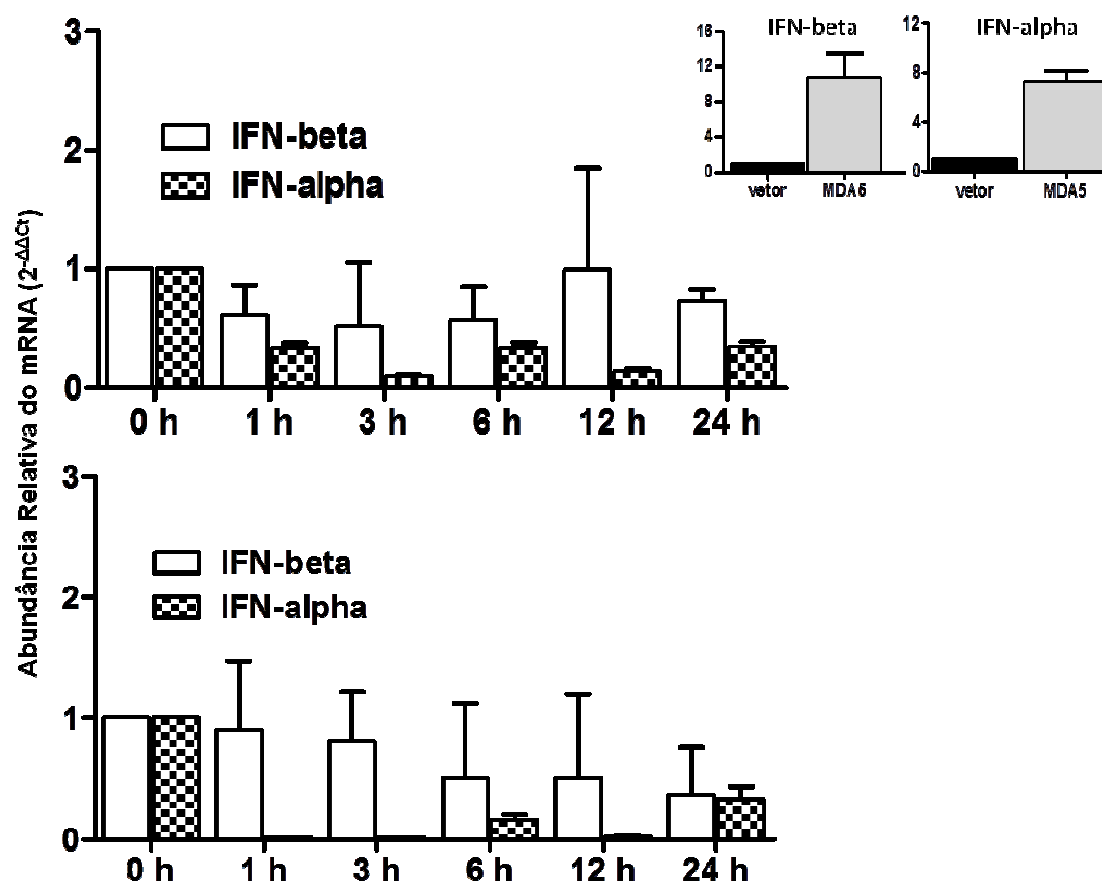


Figura 9 – Análise da abundância relativa dos mRNAs de IFN-β e subtipos de IFN-α em células THP-1 estimuladas com LPS e Pam3CSK4. Células THP-1 foram deixadas sem tratamento (0) ou estimuladas com LPS (1000 ng/mL) e com Pam3CSK4 (100 ng/mL) nos tempos indicados na figura. A partir do RNA total de cada amostra foi obtida a primeira fita de cDNA que foi diluída e submetida a reação de PCR em tempo real com os iniciadores para IFN-alfa e IFN-beta indicados. *Gráficos menores*, Análise da abundancia relativa dos mRNAs de IFN-beta e subtipos de IFN-alfa em células HEK293T transfectadas ou não com 3μg de MDA5 durante 24 horas.

Para isso, células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos contendo a região promotora de PKR (pGL2-503WTPKR), de p561 (pGL2-561) e E-Selectina (pGL3-E-Sel). Vinte e quatro horas após a transfecção, o meio foi desprezado e os sobrenadantes provenientes das células THP-1 tratadas ou não com os agonistas LPS e Pam3CSK4 foram adicionados. Paralelamente, as células transfectadas com os plasmídeos pGL2-503WTPKR e pGL2-561 também foram tratadas com IFN-A2 (1000 U/mL). As células transfectadas com o plasmídeo pGL3-E-Sel foram tratadas com TNF (10 ng/mL). Após 18 horas, o extrato celular foi obtido e utilizado para determinação da atividade da luciferase. As células HEK293T expressam apenas o receptor TLR5, que reconhece apenas flagelina, o que elimina a possibilidade da ativação direta dos promotores pelos agonistas de TLR2 e TLR4 presentes nos sobrenadantes.

Os resultados obtidos através do ensaio da atividade de luciferase demonstraram que os sobrenadantes das células THP-1 tratadas com LPS e Pam3CSK4 foram capazes de ativar o promotor responsivo a NF- κ B (pGL3-E-Sel), conforme esperado. Porém não acarretou na ativação dos promotores pGL2-503WTPKR e pGL2-561. Entretanto, o tratamento com IFN-A2 e TNF levou a ativação desses promotores, o que fornece evidências que a transfecção desses plasmídeos ocorreu de forma satisfatória (Figura 10 A). A fim de comprovar esse resultado foram coletados os sobrenadante de células THP-1 tratadas com LPS

(1µg/mL) ou Pam3CSK4 (100 ng/mL) ao longo do tempo 3, 6, 9, 12 e 24 horas. Vinte e quatro horas após a transfecção, o meio foi desprezado e os sobrenadantes provenientes das células THP-1 tratadas ou não com os agonistas LPS e Pam3CSK4 foram adicionados nas células HEK293T previamente transfectadas com o plasmídeo pGL2-503WTPKR. Novamente o promotor de PKR não foi ativado (Figura 10 B), demonstrado que ao longo dos tempos de tratamentos utilizados em nossos experimentos não ocorre síntese de interferons do tipo I.

Os resultados obtidos através desses ensaios também indicam a ausência de IFNs do tipo I durante a ativação das vias de sinalização de TLR2 e TLR4 nas células THP-1.

Para verificar se quantidades mínimas de IFNs do tipo I não estavam sendo sintetizadas após tratamento com LPS ou Pam3CSK4, células THP-1 foram tratadas com esses agonistas ou com IFN-A2 nos tempos de 5, 15 e 30 minutos e por 1, 3, 6 e 12 horas. Ao final desses tempos foram obtidos extratos protéicos que foram utilizados nos experimentos de western blot para verificação de fosforilação de STAT1.

Primeiramente, testamos a concentração e a eficiência do anticorpo anti-fosfo-STAT1. As análises das amostras obtidas com o tratamento com IFN-A2 demonstram que a partir dos primeiros minutos ocorre a fosforilação de STAT1 e

que essa permanece até os tempos finais do tratamento com uma redução a partir de 12 horas quando comparamos com o controle não tratado (dados não mostrados). Assim, os tempos de 5 e 15 minutos foram utilizados como controle nos experimentos utilizando as amostras tratadas com LPS e Pam3CSK4. O tratamento com LPS e Pam3CSK4 no intervalo de 5 minutos a 12 horas não resulta em fosforilação de STAT1 (Figura 11).

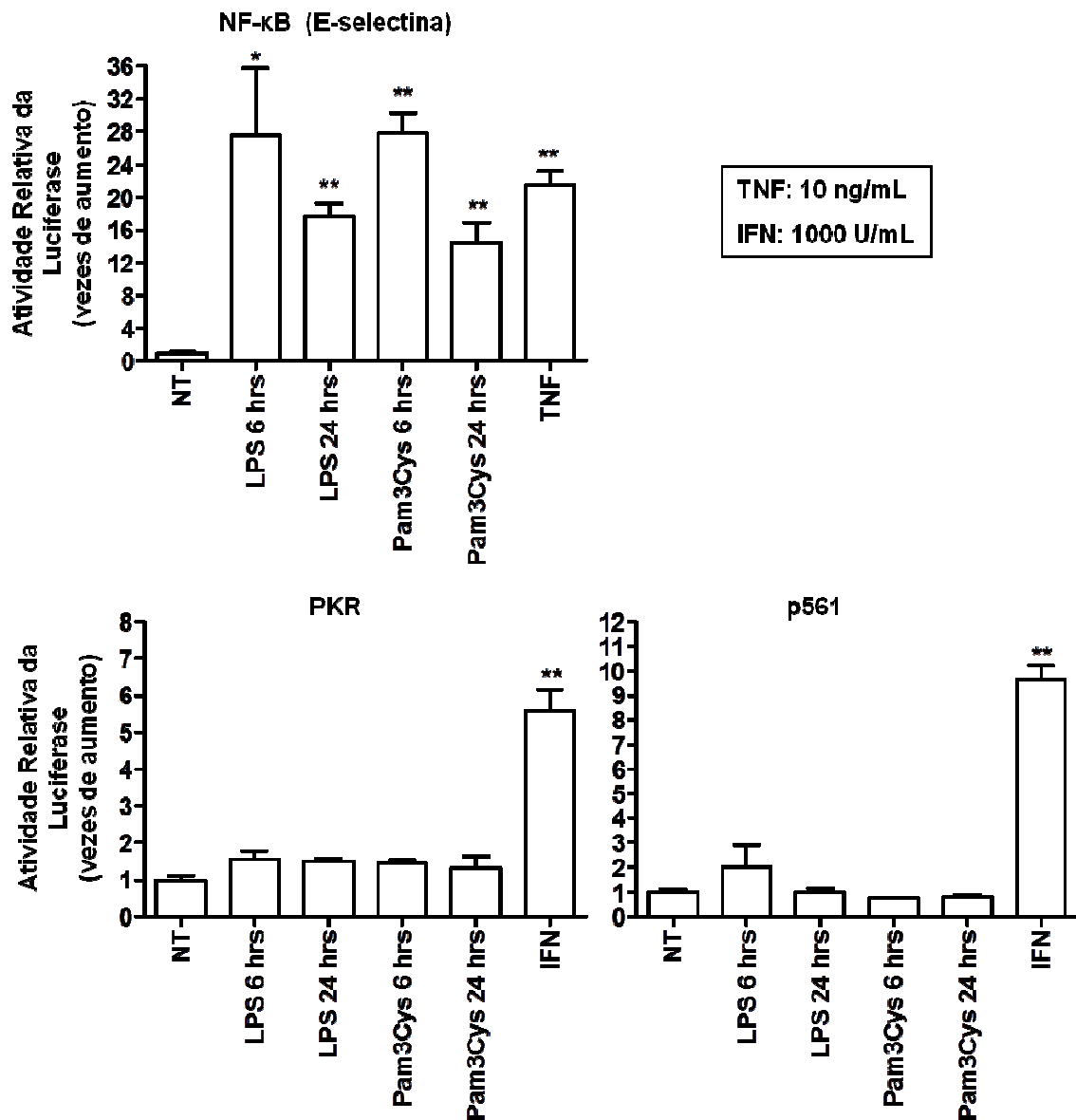


Figura 10 A – Atividade luciferase dos promotores de E-selectina, PKR e ISG56 em células HEK293T. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos pGL3-E-selectina; pGL2-503(WT)PKR e pGL2-p561. Após o tempo de transfecção essas células foram tratadas durante 18 horas com o sobrenadante de células THP-1 tratadas ou não com LPS e Pam3CSK4 por 6 e 24 horas. Como controle essas células também foram tratadas com TNF (10 ng/mL) e IFN-A2 (1000 U/mL) durante 18 horas. Ao término do experimento o extrato protéico foi obtido e a análise da atividade da luciferase foi feita em luminômetro. Média dos valores \pm s.d. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

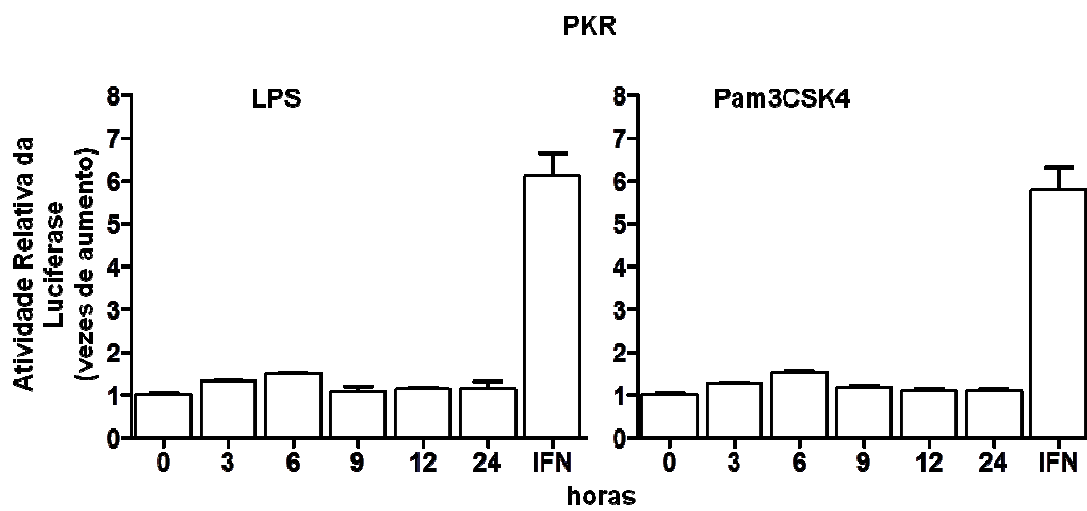


Figura 10 B - Atividade luciferase do promotor de PKR em células HEK293T. Células HEK293T foram transfectadas com o plasmídeo pGL2-503(WT)PKR . Após o tempo de transfecção essas células foram tratadas por 24 horas com o sobrenadante de células THP-1 tratadas ou não com LPS e Pam3CSK4 em diferentes intervalos de tempo conforme figura. Como controle essas células também foram tratadas com IFN-A2 (1000 U/mL) durante 24 horas. Ao termino do experimento o extrato protéico foi obtido e a análise da atividade da luciferase foi feita em luminômetro.

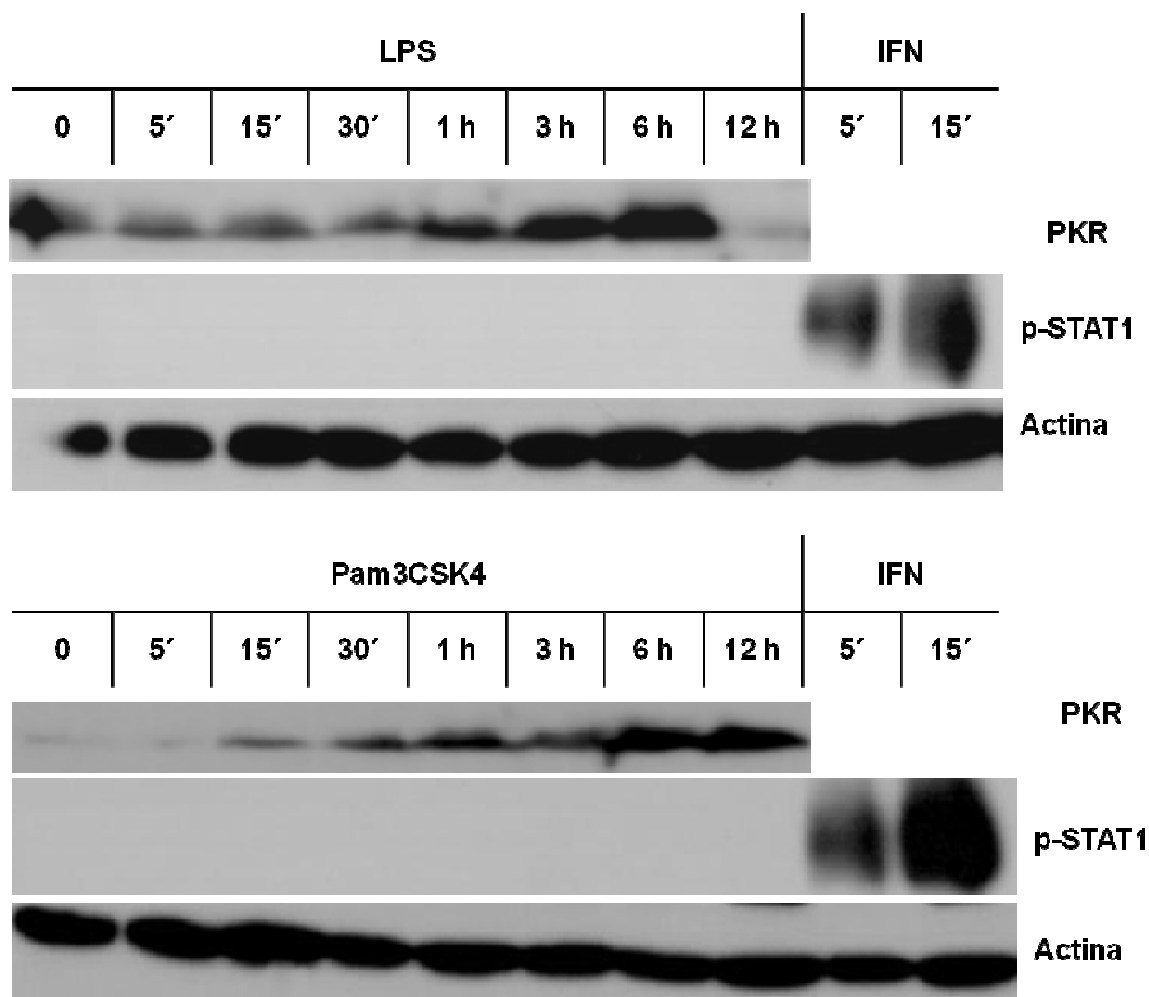


Figura 11 – Análise da via de sinalização IFN-JAK-STAT após estimulação das células THP-1 com agonistas dos receptores TLR2 e TLR4. Cinquenta microgramas dos extratos de células THP-1 estimuladas com LPS (1000 ng/mL), Pam3CSK4 (100 ng/mL) ou IFN-A2 (1000 U/mL) ao longo do tempo conforme indicado na figura ou deixadas sem tratamento (0) foram fracionados em gel de policacrilamida 10%, transferidos para membrana PVDF e analisados com anticorpos específicos como indicado na figura.

Mal/Tirap é uma proteína adaptadora citoplasmática que participa das vias de sinalização desencadeada pela ativação dos receptores TLR através de uma via MyD88-dependente. Tanto TLR2 como TLR4 utilizam essa via. Artigos recentes relatam uma via não convencional de síntese de IFNs do tipo I através da via de NF- κ B (Du et al., 2007; Pfeffer 2011). Para verificar a possibilidade da ativação do promotor de PKR em decorrência dessa via, células HEK293T foram co-transfectadas com plasmídeos pFLAG-Mal/TIRAP e pGL2-503WTPKR. A transfecção de Mal/Tirap em células HEK293T acarreta na ativação de NF- κ B (Figura 12 A). Porém, a ativação de NF- κ B parece não levar a síntese de IFNs do tipo I uma vez que não ocorreu ativação do promotor de PKR que possui os elementos KCS e ISRE sendo ativado por interferons do tipo I (Figura 12 B) (Kuhlen e Samuel 1998; Das et al., 2006). O painel A é um controle da transfecção e ativação do promotor de Mal/Tirap.

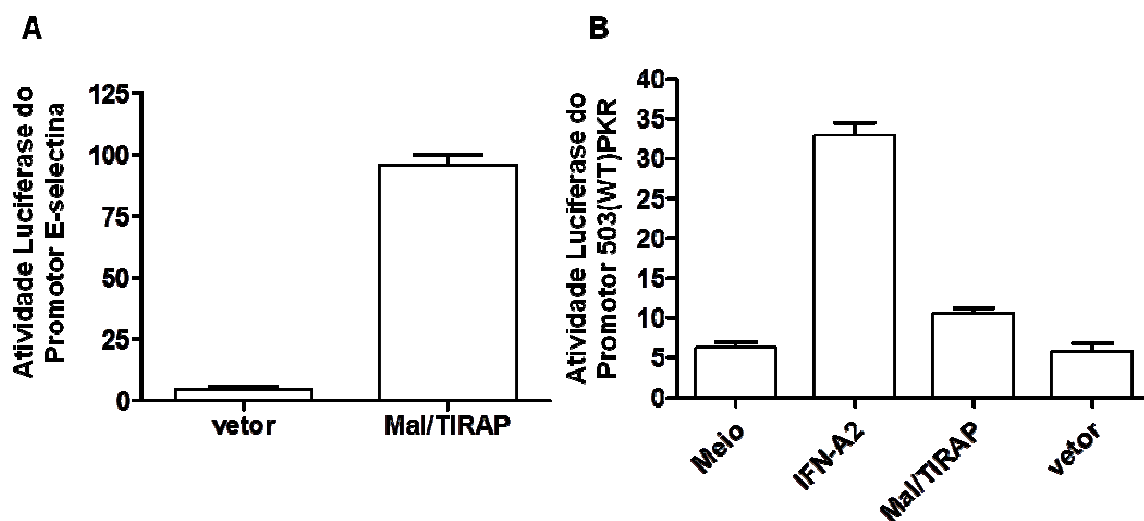


Figura 12 – Efeito da ativação da via Mal/TIRAP sobre a ativação do promotor de PKR em células HEK293T. **A)** Células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos pEF-BOS (vetor) e pFLAG-Mal/TIRAP (Mal/TIRAP), e co-transfectadas com pGL3-E-Sel e pRL-TK. **B)** As células foram deixadas sem transfecção (Meio) ou transfectadas com pEF-BOS (vetor) e pRL-TK ou com pGL2-p503(WT)PKR e pRL-TK (IFN-A2) ou com pFLAG-Mal/TIRAP, pGL2-p503(WT)PKR e pRL-TK (Mal/TIRAP). Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram deixadas sem tratamento ou tratadas com IFN-A2 (1000 U/mL) por 18 horas. Ao término do experimento, o extrato obtido foi utilizado para análise da atividade da luciferase foi feita em luminômetro.

Diversos estudos demonstram a dimerização e ativação do fator regulador de interferon IRF-3 em resposta aos agonistas TLR3 e TLR4 devido à ativação da via de sinalização dependente de TRIF e conseqüentemente ocorrendo síntese de IFN- β (Khoo et al., 2011). Após analisarmos os resultados obtidos acima questionamos se mesmo na ausência de indução de IFNs do tipo I, IRF-3 estaria sendo ativado em resposta ao tratamento com LPS nas células THP-1. Para isso, células THP-1 foram transfectadas com os plasmídeos contendo a região promotora de E-selectina (pGL3-E-Sel) ou IFN-beta (pGL3-IFN-beta), que possui dois domínios de ligação (PRD-I e PRD-III) para IRF-3 (Bandyopadhyay et al., 1995). Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram tratadas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 6 ou 12 horas. Ao final das estimulações o extrato obtido foi utilizado para leitura da atividade luciferase.

A partir desse resultado foi possível demonstrar de forma indireta que o tratamento das células THP-1 com LPS nos tempos de 6 e 12 horas que se correlacionam com os tempos em que observamos um aumento dos níveis proteicos de PKR mostrados na figura 6 B não acarreta em ativação da região promotora de IFN-beta (Figura 13 A). Como controle do experimento, nos mesmos tempos de estímulo, observamos um aumento significativo da ativação de NF- κB quando comparamos a amostra deixada sem tratamento (gráfico à esquerda – figura 13 A).

Para verificar se as células utilizadas em nosso laboratório eram capazes de responder a estímulo que leva à ativação de STAT1, células THP-1 foram tratadas com poly-IC (100 $\mu\text{g/mL}$) durante os tempos de 15, 30 minutos e 1, 2, 3, 6, 24 horas. Ao final do experimento foi obtido extrato proteico que foi utilizado no experimento de western blot para verificação da fosforilação de STAT1 em

decorrência da síntese de IFN-beta. Através do resultado obtido observamos que a fosforilação de STAT1 ocorre a partir de 2 horas de tratamento e se mantém até 24 horas de tratamento (Figura 13 B). Na figura 13 B ainda podemos notar que o aumento de expressão de PKR ocorre após fosforilação de STAT1. Como controle foi utilizado extrato da amostra tratada com IFN-A2 durante 30 minutos. STAT1 foi utilizado como normalizador.

O ácido polirribonucleotídico-policitídico (poly-IC), um ligante sintético, pode induzir a resposta celular através de TLR3 conduzindo a ativação de IRF-3, resultando na indução de IFN-beta (Matsumoto e Seya 2008).

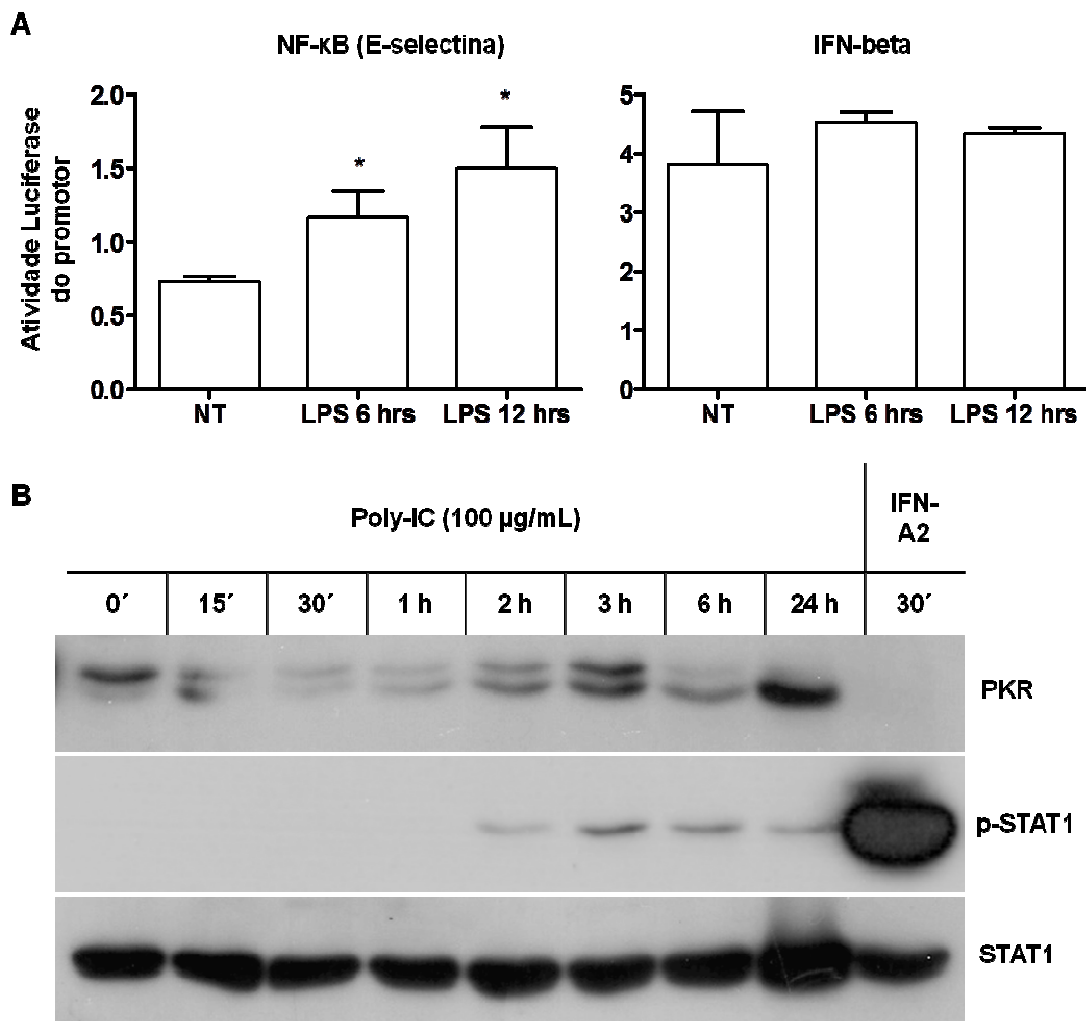


Figura 13 – (A) Atividade luciferase dos promotores de E-selectina e de IFN-beta. Células THP-1 foram transfectadas com plasmídeos pGL3-E-Sel (E-selectina) ou pGL3-IFN-beta. Após o tempo de transfecção essas células foram tratadas com LPS (1 μ g/mL) durante 6 e 12 horas. Após término do experimento o extrato proteico obtido foi utilizado para análise da atividade da luciferase em Luminômetro. Média dos valores \pm s.d. * p <0.05,** p <0.01. **(B) Análise da fosforilação de STAT1 após estimulação das células THP-1 com poly-IC.** Cinquenta microgramas dos extratos de células THP-1 deixadas sem tratamento (0) ou estimuladas com poly-IC (100 μ g/mL) nos tempos indicados na figura foram fracionados em gel de policacrilamida 12%, transferidos para membrana PVDF e analisados com anticorpos anti-fosfo-STAT1(Y 701), anti-PKR e anti-STAT1 como indicado na figura.

5.3 – Fatores de transcrição não ativados por IFNs podem estar implicados com ativação de PKR em células THP-1.

A proteína Sp-1, também conhecida como proteína específica 1 é um fator de transcrição relacionado com a expressão de uma grande variedade de genes de células mielóides (Resendes e Rosmarin 2004). Das e colaboradores em 2006 propuseram que na ausência de IFNs, PKR é ativada de forma dependente de proteínas Sp (Das et al., 2006). Portanto, para determinar se a expressão induzida de PKR requer a participação dos fatores de transcrição Sp1 e Sp3, células THP-1 foram pré-tratadas com Mitramicina (1 μ M) (MiA) durante 30 minutos, seguido do tratamento com os agonistas LPS (1 μ g/mL) e Pam3CSK4 (100 ng/mL) por 6 e 24 horas. Através dos resultados obtidos pelo ensaio de western blot observamos uma diminuição significativa dos níveis de expressão protéica de PKR quando as células foram estimuladas com os agonistas dos TLRs na presença de MiA (Figura 14), sugerindo o envolvimento desses fatores de transcrição na regulação da expressão de PKR nas células THP-1 após tratamento com agonistas TLR2 e TLR4. A exposição das células à MiA não interfere com outras vias de sinalização ativadas por TLR2 e TLR4, uma vez que a fosforilação de p38 induzida pelo tratamento não foi afetada.

A fim de verificar o envolvimento de NF- κ B, no aumento da expressão de PKR em células THP-1 tratadas com os agonistas de TLR2 e TLR4, as células THP-1 foram previamente tratadas durante 20 minutos com TPCK (25 μ M) e em seguida tratadas com LPS e Pam3CSK4 por 3 e 6 horas. O RNA total foi obtido para análise dos níveis do mRNA de PKR. As células foram também tratadas por 6, 9, 12 e 24 horas para análise dos níveis protéicos de PKR. Os resultados obtidos demonstram uma significativa redução tanto dos níveis do mRNA de PKR

quanto dos níveis protéicos (Figura 15). Para fornecer evidências adicionais do envolvimento de NF- κ B sobre a regulação da expressão de PKR, testamos outro inibidor de NF- κ B mais específico, o Bay 11-7082 em diferentes concentrações. Conforme observamos na figura 16, as concentrações de 20 e 40 μ M acarretaram em inibição do aumento dos níveis de PKR após tratamento com LPS e Pam3CSK4, respectivamente, corroborando os resultados obtidos com TPCK.

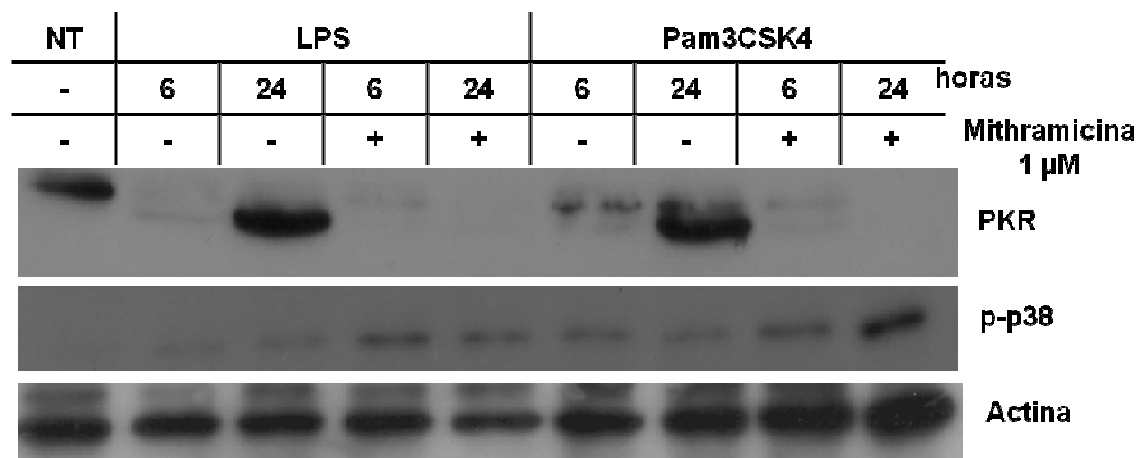
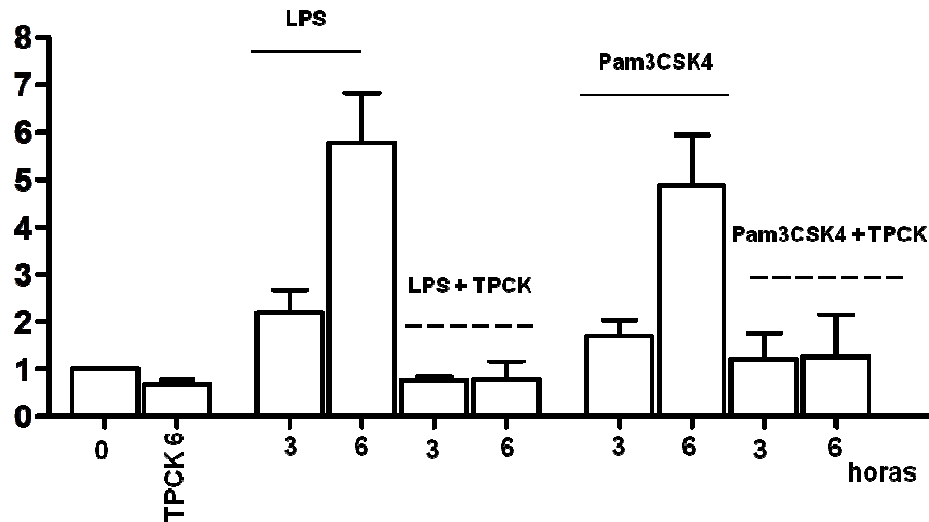


Figura 14 – Efeito da Mitramicina sobre os níveis de PKR em células THP-1 estimuladas com LPS e Pam3CSK4. Células THP-1 foram previamente tratadas com 1 μ M MiA durante 30 minutos seguido de tratamento com os agonistas TLR2/4 durante 6 e 24 horas. Trinta microgramas dos extratos proteicos obtidos foram fracionados em gel de policacrilamida 14%, transferidos para membrana PVDF e analisados com anticorpos específicos para PKR e p-p38. O anticorpo anti-actina foi utilizado para demonstrar as quantidades equivalentes de extrato aplicadas por canaleta.

A



B

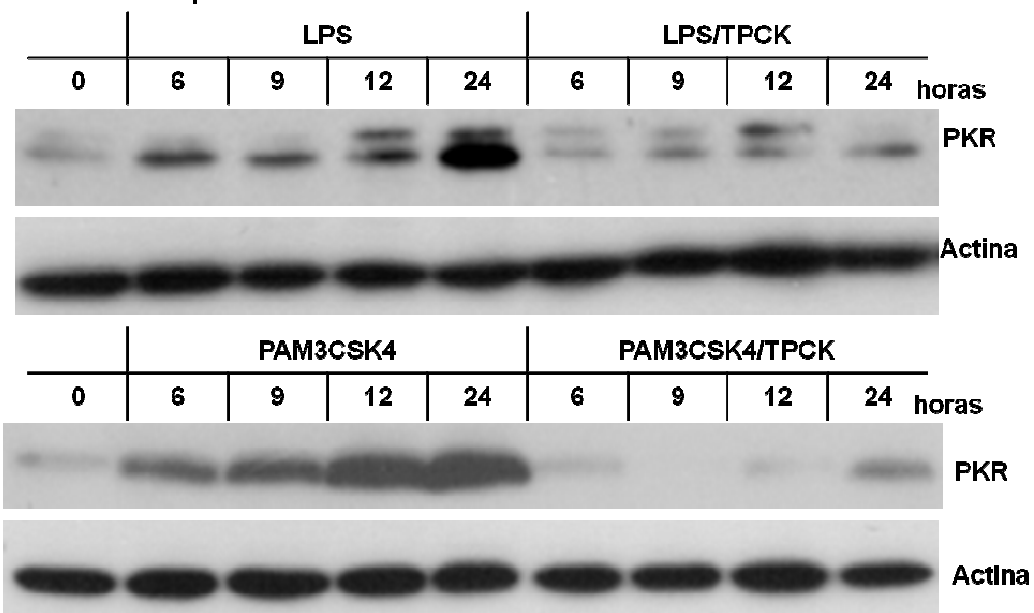


Figura 15 – Efeito de TPCK sob a expressão de PKR em células THP-1 tratadas com LPS e Pam3CSK4. Células THP-1 foram previamente tratadas com 25µM de TPCK durante 20 minutos seguido de tratamento com os agonistas TLR2 e TLR4 durante 3 e 6 horas. Ao final dos tempos foi obtido RNA total sendo utilizado como molde para a primeira fita de cDNA que foi submetido a PCR em tempo real. Também foram obtidos extratos celulares sendo que 20µg foram fracionados em gel de policacrilamida 14%, transferidos para membrana PVDF e analisados com anticorpos específicos conforme indicado.

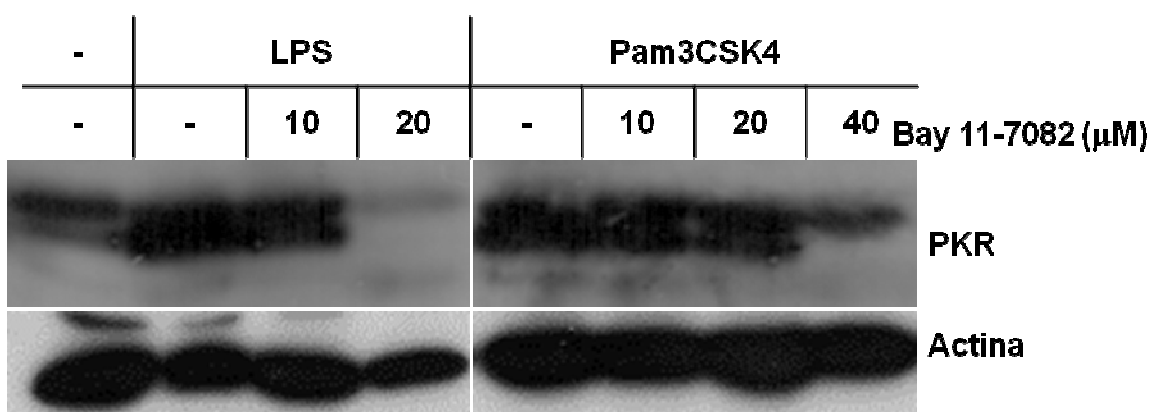


Figura 16 – Efeito de Bay 11-7082 sob a expressão de PKR em células THP-1 tratadas com LPS e Pam3CSK4. Células THP-1 também foram tratadas com Bay 11-7082 em diferentes concentrações 30 minutos antes do tratamento com os agonistas de TLR2 e TLR4 durante 24 horas. Em seguida foram obtidos extratos celulares sendo que 30 μ g foram fracionados em gel de policacrilamida 12%, transferidos para membrana PVDF e analisados com anticorpos específicos conforme indicado na figura. O anticorpo anti-actina foi utilizado para demonstrar as quantidades equivalentes de extrato aplicadas por canaleta.

5.4 – A fosforilação de STAT1 ocorre em células THP-1 diferenciadas a macrófagos tratadas com LPS

Durante processos infecciosos, os monócitos circulantes migram para os tecidos e sofrem diferenciação a macrófagos adquirindo assim um aumento notável de suas propriedades antibacterianas. O processo de diferenciação é complexo e é controlado pela expressão e ativação de múltiplos fatores de transcrição (Valledor et al., 1998; Landsman e Jung 2007). Existem diversas substâncias que acarretam *in vitro* a diferenciação de monócitos a macrófagos, dentre elas o PMA e a vitamina D3 (Bar-Shavit et al., 1983; Auwerx 1991; Qin 2011). Um estudo recente demonstrou que a diferenciação das células THP-1 a macrófagos induzida por PMA durante 3 dias é a que mais aproxima as características dos marcadores de diferenciação e de resposta celular aos macrófagos derivados de monócitos no sangue (Daigneault et al., 2010).

Assim, para diferenciação a macrófagos, células THP-1 foram tratadas com PMA 100 mM durante 72 horas. Após esse tempo as células THP-1 foram tratadas ou não com LPS (1 µg/mL) ou com Pam3CSK4 (100 ng/mL) durante 3, 6, 9, 12 e 24 horas. Ao término desses tempos, os extratos celulares obtidos foram utilizados nos experimentos de western blot. Como controle foram utilizados extratos de células THP-1 em suspensão que permaneceram em cultura durante todo tempo do experimento.

Através do resultado obtido foi possível observar que os macrófagos THP-1 respondem à estimulação com os agonistas, uma vez que observamos fosforilação de p38 nos tempos iniciais do tratamento. Além disso, o tratamento com LPS resulta na fosforilação de STAT1 desde os tempos iniciais de tratamento com redução após 24 horas quando comparadas com os controles não

diferenciado e diferenciado sem tratamento (0). Esse resultado sugere que células THP-1 diferenciadas em macrófagos sintetizam IFN-I após tratamento com LPS e não após tratamento com Pam3CSK4 conforme esperado (Figura 17). Actina e STAT1 foram utilizados como normalizadores.

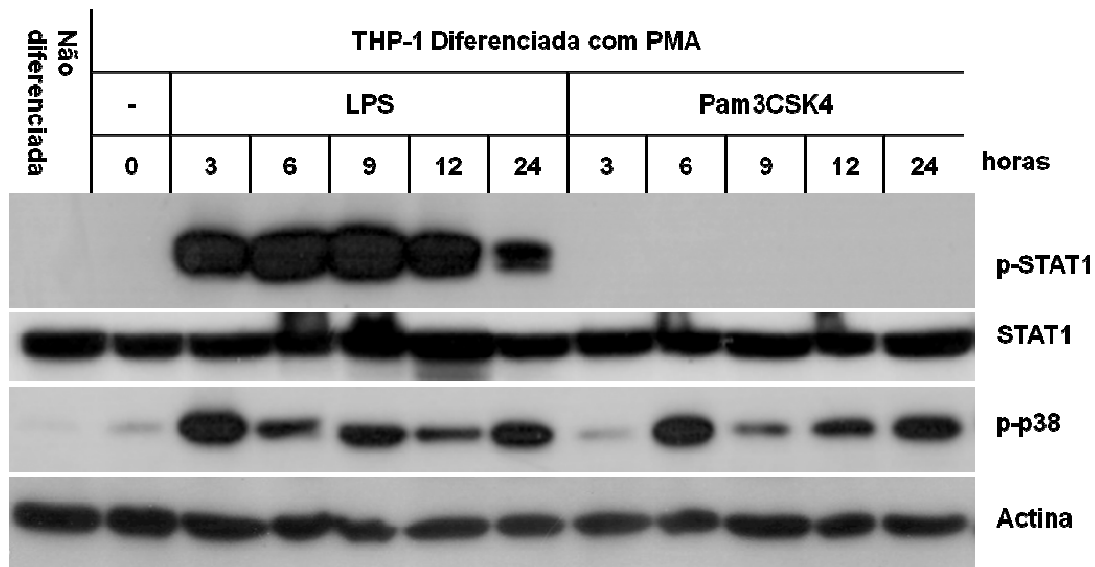


Figura 17 – Análise por Western Blot da fosforilação de STAT1 em células THP-1 diferenciadas e tratadas com os agonistas TLR2/4. Cinquenta microgramas dos extratos de células THP-1 diferenciadas ou não (Não diferenciadas) com PMA 100 mM e estimuladas ou não (0) com LPS (1 µg/mL) e Pam3CSK4 (100 ng/mL) ao longo do tempo conforme indicado na figura foram fracionados em gel de policacrilamida 12%, transferidos para membrana PVDF e analisados com anticorpos específicos como indicado.

5.5 – Camundongos deficientes de PKR sobrevivem à septicemia polimicrobiana

Estudos recentes demonstram que a proteína cinase PKR apresenta um papel durante infecções bacterianas ou em resposta a seus produtos. Até o momento não existem estudos que relatem a importância de PKR em quadros de septicemia polimicrobiana.

Alguns trabalhos tem demonstrado o papel de monócitos na sepse polimicrobiana (Annane et al., 2005; Brunialti et al., 2006; Salomão et al., 2008). A sepse é causada pela hiper-ativação do sistema imune inato, seguida de uma cascata pró-inflamatória, em resposta a infecção microbiana grave ou ao extensivo dano tecidual (como por exemplo, as causadas por queimaduras ou leões múltiplas). A ativação do sistema de complemento e a hiper-ativação das respostas imune inata estão associadas com uma resposta inflamatória excessiva que caracteriza a sepse. Assim o mau funcionamento dos mecanismos regulatórios durante a sepse pode resultar na perda do controle da inflamação (Bone et al., 1992; Angus et al., 2006; Lanoix et al., 2012).

A fim de verificar a relevância de PKR nesse quadro clínico camundongos selvagens (WT) e deficientes de PKR (PKR $-/-$) foram submetidos ao procedimento de ligadura e perfuração do ceco (CLP) letal (Hubbard et al., 2005). Após anestesia o ceco desses animais foi exposto e submetido a ligadura frouxa distal e foi perfurado em dois pontos com auxílio de agulha. Em seguida foi feita leve compressão que permitiu o extravasamento do conteúdo fecal. O ceco foi reintroduzido na cavidade peritoneal e foi realizada laparotomia. Após procedimento aguardamos o retorno dos animais da anestesia e esses foram

mantidos com em gaiolas com livre acesso a água e ração. Os animais foram então observados duas vezes por dia até o oitavo dia.

Ao termino das primeiras 24 horas todos os animais WT já haviam morrido, enquanto que 90% dos animais PKR $-/-$ permaneceram vivos até o oitavo dia quando foram sacrificados (Figura 18).

É necessária a realização de diversos experimentos que visem à análise da carga bacteriana no sangue e no peritônio desses animais, dosagem de citocinas e quimiocinas, capacidade de "killing" dos neutrófilos e que relacionem o papel de PKR na inibição da síntese de proteínas com a sobrevivência dos animais que não expressão PKR.

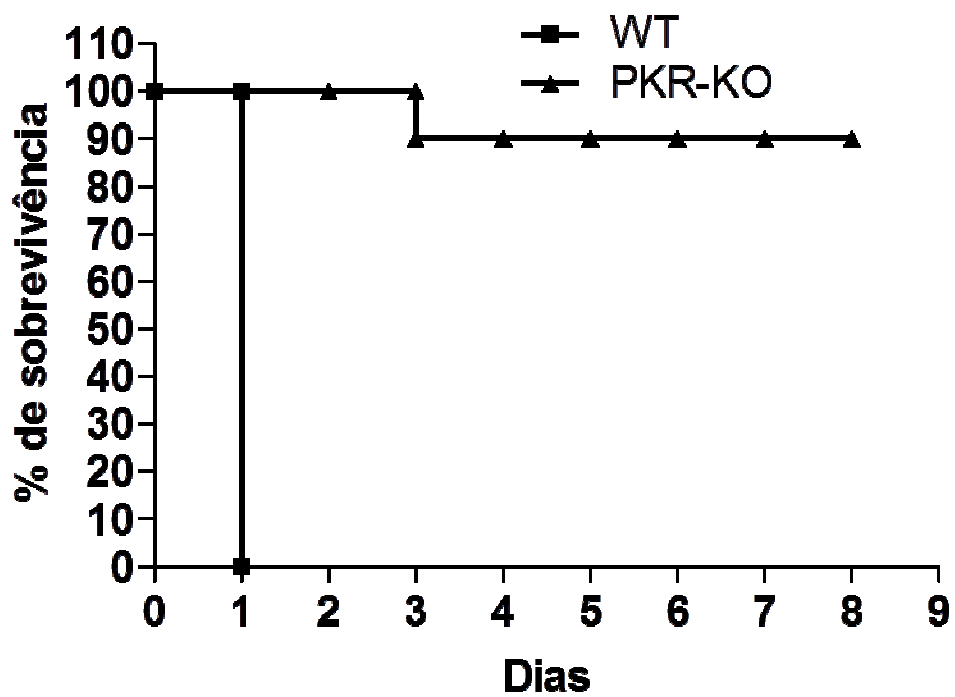


Figura 18 – Camundongos deficientes de PKR sobrevivem ao CLP. Dez animais de cada grupo foram submetidos ao CLP e foram monitorados duas vezes ao dia. No oitavo dia animais PKR-KO foram sacrificados.

6 - Discussão

O papel de PKR tem sido estudado extensivamente ao longo de vários anos nas infecções virais. No entanto, estudos têm demonstrado a sua relevância nas infecções causadas por bactérias ou por seus produtos e por parasitas.

Em seu trabalho publicado em 2004, Hsu e colaboradores apresentaram um resultado intrigante onde mostram que macrófagos obtidos de camundongos deficientes de TRIF-1 apresentavam baixos níveis de expressão de PKR, sugerindo uma potencial importância dessa molécula adaptadora para expressão de PKR em resposta ao estímulo. Porém, o mecanismo molecular envolvido ou hipóteses não foram abordados para especular esta observação (Hsu et al., 2004)

Já Cheung e colaboradores (2005), ao utilizarem monócitos humanos do sangue periférico estimulados com bacillus de Calmette-Guérin, observaram que essas células expressavam IL-6, IL-10 e TNF- α de maneira dependente de PKR, baseando-se em ensaios de transfecção com a forma inativa de PKR e também com a utilização de 2-aminopurina, um inibidor relativamente específico de PKR (Cheung et al., 2005).

Embora os níveis de expressão de PKR não tenham sido determinados nessas células, esses autores concluíram que PKR possui um papel crítico na regulação da resposta imune a infecções causadas por micobactérias, suportando a hipótese que PKR é importante para resposta imune inata desencadeada por esses microorganismos. Além disso, a fosforilação de PKR é observada quando macrófagos alveolares murinos são estimulados por LPS e Pam3CSK4 resultando na produção de citocinas inflamatórias, cuja síntese parece ser dependente da fosforilação de PKR (Cabanski et al., 2007) . Neste mesmo trabalho, foi mostrado

que PKR ativada nessas células pode regular a fosforilação de JNK1/2 induzida pelo tratamento com os dois agonistas. Entretanto, a ativação de NF- κ B, também regulada por PKR, é induzida apenas através da ativação de TLR4. Assim, esses dados sugerem que a ativação de PKR é um passo importante na resposta inflamatória mediada por TLR2 ou por TLR4, pelo menos em camundongos.

Contudo, o mecanismo pelo qual PKR é ativada e qual o seu papel em infecções não-virais permanece obscuro.

O nosso estudo mostrou que os agonistas de TLR4 e TLR2 são capazes de induzir a transcrição do mRNA de PKR e sua tradução nas concentrações mais elevadas dos agonistas LPS e Pam3CSK4 em células promonocíticas humanas THP-1 e de forma tempo dependente. Esses resultados demonstraram que PKR pode ter um papel importante na resposta imune desencadeada por infecções bacterianas em monócitos humanos, uma vez que estas células apresentam capacidade fagocítica e expressão diversos receptores de patógenos incluindo TLRs (LaRue 1994; Tsuchiya et al., 1980) (Figuras 3 e 5).

Através dos resultados de fosforilação de I κ B- α podemos notar que os estímulos foram efetivos e desencadearam vias de sinalização inflamatórias, uma vez que a fosforilação de I κ B- α nos resíduos de Ser32 e Ser36 pelas IKKs é um sinal que determina a sua degradação mediada por ubiquitinas pela via proteossômica e posterior liberação de NF- κ B que é translocado para o núcleo. Alguns estudos demonstram a complexidade da regulação de I κ B- α necessária para garantir que NF- κ B seja rapidamente e especificamente ativado (Pando e Verma 2000; Ramana e Srivastava, 2006; Parsons e Greer, 2006). O aumento da síntese de TNF- α e a fosforilação de p38 fornecem evidências diretas da ativação de vias inflamatórias (Kawai e Akira 2010) (Figuras 7).

O tratamento das células THP-1 com LPS e Pam3CSK4 resultou na indução de PKR, conforme mencionado acima, mas surpreendentemente não resultou na síntese de IFN-I conforme esperado devido ao fato de eif2ak2 ser conhecido como um gene induzido por interferon (Williams 2001).

Apesar de não termos dosado os níveis de interferons do tipo I no sobrenadante das células THP-1 devido a dificuldades técnicas, a ausência dessa citocina foi evidenciada pela ausência da transcrição do RNA mensageiro de IFN-beta e subtipos de IFN-alfa (Figura 9); pela não ativação de promotores ativados por IFNs-I, como PKR e ISG56 (Figura 10 A e B); e pela ausência de fosforilação de STAT1, uma proteína envolvida na via de sinalização Jak/STAT (Figura 11).

Porém este fato pode ser justificado uma vez que Hayes e colaboradores demonstraram que monócitos humanos tratados com LPS são capazes de sintetizar interferons somente se essas células forem primadas com o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos, GM-CFS (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) ou IFN- γ . Nesse estudo não foram detectados nessas células síntese de interferons do tipo I em decorrência ao tratamento com LPS, mesmo durante dois dias de tratamento com LPS (Hayes et al., 1991).

Outro estudo mostrou que somente monócitos e PBMCs pré-tratados com IFN-beta poderiam sintetizar IFN-alfa em consequência ao tratamento com LPS (Richez et al., 2009). No entanto um estudo recente sugeriu que em monócitos obtidos de PBMCs, IRF-8 e PU.1 se associam formando um complexo que se liga a região promotora de IFN- β facilitando o recrutamento de IRF-3 e consequentemente levando a transcrição de IFN- β em resposta ao tratamento com LPS e vírus Sendai (Li et al., 2011). Essas diferenças observadas entre

esses grupos e o nosso pode estar relacionada com os diferentes métodos de obtenção de monócitos (Wong et al., 2012).

Entretanto, já foi demonstrado que em neutrófilos humanos a expressão de genes estimulados por IFNs devido tratamento com LPS não requer a secreção de mediadores como IFN α/β ou em decorrência da ativação de STAT. O sobrenadante obtido dessas células tratadas com LPS reteve a capacidade de induzir a expressão de Mx1, outro gene estimulado por IFNs, de forma independente de IFN do tipo I, mas dependente da ativação da MAPK p38 (Malcolm e Worthen 2003).

Apesar de um trabalho recente ter sugerido a síntese de interferons do tipo I em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* pela via de sinalização de TLR2 com aumento da expressão de PKR (Vivarini et al., 2011), Barbalat e colaboradores (2009) demonstraram que em monócitos a ativação de TLR2 resulta em síntese de IFN-I apenas pelo reconhecimento de moléculas virais e não devido ao reconhecimento de agonistas bacterianos (Barbalat et al., 2009).

Os tratamentos com os agonistas TLR2/4 promoveram a adesão dos monócitos à superfície das placas utilizadas em nosso estudo (dado não mostrado). Este fato também foi comentado por Lackman e Cresswell em 2006, quando esses autores estimularam células THP-1 com LPS e com *Escherichia coli*, elas aderiram à superfície de cultivo, no entanto isso não foi observado quando essas células eram estimuladas por IFN- γ . O mesmo foi observado por nós quando as células THP-1 foram tratadas com IFN-A2.

Esse fato também foi observado e fotografado por Takashiba e colaboradores (1999), e em seus estudos, esses pesquisadores também demonstraram que essas células apresentavam um acúmulo citoplasmático de

NF- κ B e que após tratamento com LPS (100 ng/mL), NF- κ B rapidamente era translocado para o núcleo onde induzia uma rápida síntese de TNF- α . Esses autores levantam a hipótese que NF- κ B tenha um importante papel na diferenciação de monócitos a macrófagos preparando-os para responder rapidamente a infecção (Takashiba et al., 1999). A participação de NF- κ B nos processos de diferenciação celular também já foi demonstrada em estudo que utilizou células dendríticas (Campbell et al., 2011).

Também analisamos de forma indireta a ativação de IRF-3. Através do resultado obtido podemos notar que o fator de transcrição IRF-3 parece não participar da via de sinalização desencadeada pelo tratamento com LPS uma vez que células THP-1 transfectadas com o plasmídeo pGL3-IFN-beta que possui dois sítios de ativação para IRF-3 na região promotora não é ativado após tratamento com LPS durante 6 e 24 horas (figura 13 A), sugerindo mais uma vez a ausência de participação da via JAK/STAT nesse contexto.

Entretanto quando essas células foram tratadas com agonista que sinaliza através da via TRIF-dependente, poly-IC, foi possível observar que a partir de 2 horas de tratamento que ocorreu uma discreta fosforilação de STAT1 e que essa fosforilação precedeu o aumento dos níveis proteicos de PKR (figura 13 B). Poly-IC ao ser reconhecido por TLR3 induz a ativação de IRF-3 conduzindo a síntese de IFN-beta (Matsumoto e Seya 2008). Esse resultado sugere que em células THP-1 tratadas com poly-IC a via de sinalização STAT1 pode ser ativada.

A obtenção desse resultado nos levou a levantar a hipótese de que as células THP-1 tratadas com LPS sinalizam preferencialmente pela via MyD88 dependente, uma vez que não observamos a síntese de IFNs-I e ativação de IRF-3. Além disso, como poly-IC é um forte indutor de IFN-beta era esperada uma

robusta fosforilação de STAT1, o que não foi observado. Este fato nos levou a acreditar que as essas células THP-1 apresentem uma expressão reduzida ou nenhuma de TLR3. Alguns autores já demonstraram que em monócitos não é observada o aumento dos níveis do mRNA de TLR3 em resposta a seu agonista (O'Mahony et al., 2008; Ketloy et al., 2008; Visintin et al., 2001).

Em outro estudo foi observado que células THP-1 não apresentam níveis basais do mRNA de TLR3 e que não repondem a resposta aos estímulos de IFN- β ; IFN- α e LPS (Heinz et al., 2003). Apesar de outro estudo ter demonstrado que a ativação de TLR3 em monócitos induzida por LPS ocorre de forma dependente da via TLR4-MyD88-IRAK-TRAF6-NF- κ B (Pan et al., 2011).

Além disso, um grupo de pesquisadores demonstrou que em células dendríticas derivadas de monócitos a estabilização dos transcritos de IFN- β ocorre de forma TRIF-dependente pela ativação de TLR3 em resposta ao dsRNA (Johnsen et al., 2012).

No entanto, a região promotora de PKR apresenta sítios para outros fatores de transcrição como NF- κ B-*like* e Sp1/3, relacionados com as respostas celulares a inflamação e a infecções bacterianas e com a diferenciação celular e que podem ser alvos para a transcrição de eif2ak2 (Valledor et al., 1998; Tanaka e Samuel 1994; Ward e Samuel 2002). Além disso, foi demonstrado que na ausência de interferons do tipo I o aumento da expressão de PKR pode ocorrer devido a regulação cooperativa de Sp1e Sp3 (Das et al., 2006).

Para verificar essa possibilidade células THP-1 foram tratadas com Mitramicia A, inibidor de Sp1, e com dois inibidores de NF- κ B (TPCK e Bay 11-7082) com objetivo de verificar o envolvimento desses fatores de transcrição no aumento de expressão de PKR.

Esses inibidores agem da seguinte forma: a mitramicina é um fármaco que se liga a regiões G-C do DNA inibindo a ativação de regiões promotoras ricas nessas sequências. Sítios para Sp-1 são ricos em C-G (Blume et al., 1991). Já TPCK age pela inibição proteolítica de I κ B α . Como consequência, I κ B α não degradada, impede a translocação de NF- κ B do citoplasma para o núcleo (Henkel et al., 1993). Enquanto que Bay 11-7082 inibe seletivamente e irreversivelmente a ativação de NF- κ B pelo bloqueio da fosforilação de I κ B- α induzida por TNF- α (Pierce et al., 1997).

Através dos resultados obtidos (figuras 14; 15 e 16) verificamos a importância desses fatores de transcrição (Sp1 e NF- κ B) para regular o aumento da expressão de PKR devido ativação de TLR2 e TLR4 em células THP-1.

Monócitos se diferenciam a macrófagos e diversos estudos tem mostrado a relevância da via de sinalização de IFNs em macrófagos em resposta a diversos estímulos (Mboko et al., 2012; Ma 2010; Landsman e Jung 2007). Assim, a fim de verificar a ativação da via de sinalização de IFNs-I (Jak/STAT) em macrófagos, células THP-1 foram tratadas durante 72 horas com PMA. O PMA além de conduzir essas células a possuírem características semelhantes aos macrófagos derivados de monócitos do sangue também protege a célula da apoptose uma vez que ao serem tratadas com Estaurosporina, um potente indutor de apoptose via caspase 3, essas células mantiveram os níveis elevados de Mcl-1, uma proteína anti-apoptótica (Daigneault et al., 2010). Após esse tempo de diferenciação (72 horas) essas células foram tratadas com LPS e Pam3CSK4 ao longo do tempo (Figura 17).

O resultado obtido demonstrou que essas células foram sensíveis ao tratamento com ambos os agonistas uma vez que observamos fosforilação de p38

em tempos iniciais de tratamento (3 e 6 horas respectivamente) e permanecendo até o tempo mais tardio utilizado em nosso estudo (24 horas) e que o tratamento com LPS acarretou na fosforilação de STAT1, sugerindo ativação da via TRIF-dependente que conduzindo a ativação de IRF-3 e síntese de IFN-beta (Xia et al., 2012; Zhao et al., 2012) (Figura 17).

Os monócitos e neutrófilos desempenham um papel central na patofisiologia da sépsis e estão envolvidos na resposta protetora durante esse processo (Annane et al., 2005; Brunialti et al., 2006; Salomão et al., 2008).

A sepse é uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade nas unidades de terapias intensivas (Angus et al., 2006). A taxa de mortalidade ao redor do mundo é de aproximadamente 35% apesar do tratamento imediato com antibióticos, da reposição hídrica adequada e do apoio tecnológico para manter a função de órgãos afetados (Polderman et al., 2004). No Brasil, um estudo nas regiões Sul e Suldeste revelou as altas taxas de mortalidade de pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico (34,7%; 47,3% e 52,2% respectivamente) (Silva et al., 2004).

Até o momento não existem dados na literatura que relacione PKR com quadros de sepse bacterianos, apesar de diversos trabalhos terem demonstrado a importância dessa proteína em infecções bacterianas. Além disso conforme mencionado anteriormente monócitos são células importantes na resposta do hospedeiro à infecção e inflamação (Lawrence et al., 2007; Gordon e Taylor 2005). Nossos resultados também demonstram a participação de PKR em células THP-1 (uma linhagem promonocítica) em respostas aos agonistas bacterianos LPS e Pam3CSK4. Assim, a fim de examinar uma potencial contribuição *in vivo*

de PKR, avaliamos a sobrevivência de camundongos WT e PKR^{-/-} submetidos a ligadura e perfuração do ceco (*CLP – cecal ligation and puncture*).

Através do resultado obtido (Figura 18) observamos que camundongos deficientes de PKR sobrevivem a sepse grave sugerindo um papel prejudicial de PKR na sepse grave no modelo utilizado por nós. Obviamente que mais estudos precisam ser realizados a fim de relacionar o papel de PKR à sobrevivência desses animais.

Diferentemente de PKR, alguns estudos de sepse já foram realizados com camundongos deficientes do receptor de IFNs do tipo I (IFNAR^{-/-}). Em 2010 foi publicado um estudo em que camundongos 129 SvEv selvagens e IFNAR^{-/-} foram submetidos a sepse experimental de modo que 10 a 20% dos animais controles permanecem vivos até o décimo dia após cirurgia. Esses pesquisadores optaram por este modelo porque segundo eles esse se aproxima mais dos quadros de sepse em humanos. Eles demonstraram que os camundongos IFNAR^{-/-} eram mais sensíveis a esse procedimento e morreram em maior número quando comparado aos selvagens (Kelly-Scumpia, 2010).

No entanto em um experimento piloto que realizamos em colaboração camundongos 129 SvEv selvagens e IFNAR^{-/-} foram submetidos a sepse grave conforme descrito para os animais PKR^{-/-} e foi observada a morte desses animais de forma semelhante entre os dois grupos (dados não mostrados). Após esses resultados levantamos a hipótese de que mesmo na ausência do sistema IFN-I, PKR possa ser expressa e os efeitos prejudiciais de sua ativação sejam observados nos camundongos IFNAR^{-/-}.

No entanto, outros estudos já demonstraram que a ausência do sistema de IFN-I apresenta um caráter protetor uma vez que não foi observado um quadro hiperinflamatório (Mahieu et al., 2006; Weighardt et al., 2006).

O papel de PKR na inibição da síntese de proteínas em infecções virais é bem conhecido. A autofosforilação de PKR em resposta ao dsRNA conduz a fosforilação de eIF2 α resultando na inibição da síntese de proteínas (Budt et al., 2009; Garcia et al., 2006; Zhang et al., 2008; Galabru e Hovanessian 1987; Rhoads 1993).

Resultados previamente obtidos visaram analisar a fosforilação de PKR, do seu substrato eIF2 α , e a síntese de proteínas em células THP-1 tratadas com LPS (1 μ g/mL) durante 15, 45 e 90 minutos e 3, 6, 9, 12 e 24 horas. Através dos experimentos de western blot foi possível observar que níveis significativos de fosforilação de PKR ocorrem nos tempos de 6, 9, 12 e 24 horas, ocorrendo também a fosforilação de eIF2 α . Após esses resultados foi avaliada a síntese de proteínas através do ensaio de marcação metabólica com metionina S³⁵. As células THP-1 foram novamente tratadas com LPS (1 μ g/mL) nos mesmos tempos citados acima. Através desse resultado obtido observamos que após 15 minutos de tratamento ocorreu um aumento da síntese de proteínas que se estendeu até 6 horas de tratamento. Entre os tempos de 6 e 9 horas foi observado uma redução da síntese de proteínas que se estendeu até 24 horas. A redução na síntese de proteínas entre os tempos de 9 a 24 horas correlacionaram com o aumento da expressão e da ativação de PKR e fosforilação de eIF2 α . Além disso, também observamos que a inibição da síntese de proteínas ocorre de forma dose dependente durante 18 horas de tratamento com LPS.

A fim de demonstrar que a inibição da síntese proteica induzida por LPS é regulada por PKR, esplenócitos derivados do baço de camundongos selvagens ou deficientes de PKR (Chakrabarti et al., 2008) foram tratados com LPS em diferentes intervalos de tempo (90 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas) e a inibição da síntese de proteínas foi mais uma vez avaliada pelo método de marcação metabólica com metionina S³⁵. O resultado obtido mostrou que a inibição da síntese de proteínas ocorre após 90 minutos de tratamento com LPS e que essa inibição é mantida até 24 horas em ambos os grupos. Contudo comparando o perfil de síntese de proteínas nas células obtidas dos camundongos selvagens e deficientes de PKR nos tempos de 12 e 24 horas o perfil de inibição é mais pronunciado nas células obtidas dos camundongos selvagens (84.1% em 12 horas e 92.3% em 24 horas) do que nas células obtidas dos camundongos deficientes de PKR (58,3% em 12 horas e 60.5% em 24 horas) indicando o papel de PKR na regulação da síntese de proteínas em células tratadas com LPS.

Enquanto que em infecções virais a inibição da síntese de proteínas em decorrência da ativação de PKR acarreta no controle da infecção (Williams 2001), no contexto das infecções bacterianas ainda precisa ser investigado. Em um contexto sistêmico os resultados obtidos de camundongos deficientes de PKR submetidos à sepse sugerem que PKR tem um papel prejudicial, uma vez que 90% desses camundongos sobreviveram ao procedimento de CLP durante 8 dias.

7 - Conclusão

Através desse conjunto de resultados é possível concluir que:

- Em células THP-1 tratadas com LPS e Pam3CSK4 ocorre o aumento transcricional e proteico de PKR.

- O aumento da expressão de PKR nas células THP-1 tratadas com LPS e Pam3CSK4 ocorre de forma independente de interferons do tipo I.

- Os fatores de transcrição Sp e NF- κ B apresentam um papel relevante no aumento dos níveis de expressão de PKR em células THP-1 tratadas com LPS e Pam3CSK4.

- Em células THP-1 diferenciadas a macrófagos o tratamento com LPS acarreta na síntese de interferon do tipo I uma vez que observamos fosforilação de STAT1.

- E que PKR parece ter um papel prejudicial nos quadros de septicemia.

Assim, esses resultados demonstram que PKR emerge como uma proteína relevante em quadros de infecção bacteriana.

8 – Referências Bibliográficas

- Albiger, B, Dahlberg, S., Henriques-Normark, B, Normark, S (2007) Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 261, 511-28.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. In *Nature*, Volume 413 732-738.
- Anderson, K.V., Bokla, L., Nusslein-Volhard, C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-8.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365, 63-78.
- Angus DC, Pereira CA, Silva E (2006) Epidemiology of severe sepsis around the world. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6, 207-212.
- Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, Paludan SR (2006) Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J Virol* 80, 4501-4509.
- Auerbuch V, Brockstedt DG, Meyer-Morse N, O'Riordan M, Portnoy DA (2004) Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* 200, 527-533.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692
- Balachandran, S., Kim, C.N., Yeh, W.C., Mak, T.W., Bhalla, K., Barber, G.N. (1998) Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J* 17, 6888-902.
- Bandyopadhyay SK, Leonard GT, Jr., Bandyopadhyay T, Stark GR, Sen GC (1995) Transcriptional induction by double-stranded RNA is mediated by interferon-stimulated response elements without activation of interferon-stimulated gene factor 3. *J Biol Chem.* 270, 19624-19629
- Baqui AA, Meiller TF, Chon JJ, Turng BF, Falkler WA, Jr. (1998) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor amplification of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha production in THP-1 human monocytic cells stimulated with lipopolysaccharide of oral microorganisms. *Clin Diagn Lab Immunol* 5, 341-347.
- Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM (2009) Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol* 10, 1200-1207.

- Bar-Shavit Z, Teitelbaum SL, Reitsma P, Hall A, Pegg LE, Trial J, Kahn AJ (1983) Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 5907-5911.
- Bennett RL, Blalock WL, May WS (2004) Serine 18 phosphorylation of RAX, the PKR activator, is required for PKR activation and consequent translation inhibition. *J Biol Chem.* 279, 42687-42693. Epub 42004 Aug 42686.
- Bergeron J, Benlimame N, Zeng-Rong N, Xiao D, Scrivens PJ, Koromilas AE, Alaoui-Jamali MA (2000) Identification of the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase as a regulator of cellular response to bulky adducts. *Cancer Res* 60, 6800-6804.
- Blume SW, Snyder RC, Ray R, Thomas S, Koller CA, Miller DM (1991) Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 88, 1613-1621.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644-1655.
- Bouwman P, Philipsen S (2002) Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195, 27-38.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- Braun H, Koop R, Ertmer A, Nacht S, Suske G (2001) Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acids Res* 29, 4994-5000.
- Brunialti MK, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM, Salomao R (2006) TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock* 25, 351-357.
- Budt M, Niederstadt L, Valchanova RS, Jonjic S, Brune W (2009) Specific inhibition of the PKR-mediated antiviral response by the murine cytomegalovirus proteins m142 and m143. *J Virol* 83, 1260-1270.
- Cabanski, M., Steinmuller, M., Marsh, L., Surdziel, E., Seeger, W., Lohmeyer, J. (2007) PKR Regulates TLR2/TLR4-dependent Signaling in Murine Alveolar Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9, 9.
- Campbell IK, van Nieuwenhuijze A, Segura E, O'Donnell K, Coghill E, Hommel M, Gerondakis S, Villadangos JA, Wicks IP (2011) Differentiation of inflammatory dendritic cells is mediated by NF-kappaB1-dependent GM-CSF production in CD4 T cells. *J Immunol* 186, 5468-5477.

- Carrero JA, Calderon B, Unanue ER (2004) Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection. *J Exp Med* 200, 535-540.
- Carrero JA, Unanue ER (2006) Lymphocyte apoptosis as an immune subversion strategy of microbial pathogens. *Trends Immunol* 27, 497-503.
- Chakrabarti A, Sadler AJ, Kar N, Young HA, Silverman RH, Williams BR (2008) Protein kinase R-dependent regulation of interleukin-10 in response to doublestranded RNA. *J Biol Chem* 283, 25132-25139.
- Cheshire JL, Williams BR, Baldwin AS, Jr. (1999) Involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in the synergistic activation of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon in preneuronal cells. *J Biol Chem* 274, 4801-4806.
- Cheung, B.K., Lee, D.C., Li, J.C., Lau, Y.L., Lau, A.S. (2005) A role for double-stranded RNA-activated protein kinase PKR in *Mycobacterium*-induced cytokine expression. *J Immunol.* 175, 7218-25.
- Chun RF, Semmes OJ, Neuveut C, Jeang KT (1998) Modulation of Sp1 phosphorylation by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J Virol* 72, 2615-2629.
- Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., Akira, S. (2005) Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 201, 19-25.
- Colonna M (2007) TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own. *Eur J Immunol* 37, 306-309.
- Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH (2010) The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 5, e8668.
- Das S, Ward SV, Tacke RS, Suske G, Samuel CE (2006) Activation of the RNA-dependent protein kinase PKR promoter in the absence of interferon is dependent upon Sp proteins. *J Biol Chem.* 281, 3244-3253. Epub 2005 Dec 3248.
- Deb A, Haque SJ, Mogensen T, Silverman RH, Williams BR (2001) RNA-dependent protein kinase PKR is required for activation of NF-kappa B by IFN-gamma in a STAT1-independent pathway. *J Immunol* 166, 6170-6180.
- Deb A, Zamanian-Daryoush M, Xu Z, Kadereit S, Williams BR (2001). Protein kinase PKR is required for platelet-derived growth factor signaling of c-fos gene expression via Erks and Stat3. *EMBO J* 20, 2487-2496.

- Der, S.D., Yang, Y.L., Weissmann, C., Williams, B.R. (1997) A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3279-3283.
- Dey, M., Cao, C., Dar, A.C., Tamura, T., Ozato, K., Sicheri, F., Dever, T.E. (2005) Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell* 122, 901-13.
- Diebold, S.S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L.E., Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P., Reis e Sousa, C. (2003) Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature*. 424, 324-8. Epub 2003 Jun 22.
- Dietrich N, Lienenklaus S, Weiss S, Gekara NO (2010) Murine toll-like receptor 2 activation induces type I interferon responses from endolysosomal compartments. *PLoS One* 5, e10250.
- Du Z, Wei L, Murti A, Pfeffer SR, Fan M, Yang CH, Pfeffer LM (2007) Non-conventional signal transduction by type 1 interferons: the NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem* 102, 1087-1094.
- Dziarski R., Viriyakosol S. Kirkland T.N., Gupta D. (2000) Soluble CD14 enhances membrane CD14-mediated responses to peptidoglycan: structural requirements differ from those for responses to lipopolysaccharide. *Infect Immun*; 68: 5254-5260.
- Edelmann KH, Richardson-Burns S, Alexopoulou L, Tyler KL, Flavell RA, Oldstone MB (2004) Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology* 322, 231-238.
- Fasciano S, Hutchins B, Handy I, Patel RC (2005) Identification of the heparin-binding domains of the interferon-induced protein kinase, PKR. *Febs J* 272, 1425-1439.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., Maniatis, T. (2003) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 4, 491-6.
- Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M., Golenbock, D.T. (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198, 1043-55.
- Galabru J, Hovanessian A (1987) Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *J Biol Chem* 262, 15538-15544.
- Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C, Esteban M (2006) Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 1032-1060.

- Garaigorta U, Chisari FV (2009) Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* 6, 513-522.
- Gay, N.J., Keith, F.J. (1991) *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-6.
- Ghosh S, Hayden MS (2008) New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8, 837-848.
- Gil J, Alcamí J, Esteban M (2000) Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. *Oncogene* 19, 1369-1378.
- Gil J, Garcia MA, Gomez-Puertas P, Guerra S, Rullas J, Nakano H, Alcamí J, Esteban M (2004) TRAF family proteins link PKR with NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 24, 4502-4512.
- Goh KC, deVeer MJ, Williams BR (2000) The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. *EMBO J* 19, 4292-4297.
- Goldberg HJ, Whiteside CI, Hart GW, Fantus IG (2006) Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology* 147, 222-231.
- Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.
- Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.
- Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Garcia MA, Zaballos A, Esteban M (2006) Human gene profiling in response to the active protein kinase, interferon-induced serine/threonine protein kinase (PKR), in infected cells. Involvement of the transcription factor ATF-3 IN PKR-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281, 18734-18745.
- Guo B, Chang EY, Cheng G (2008) The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* 118, 1680-1690.
- Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G (1994) Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J* 13, 3843-3851.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-103.

- Hayes MP, Enterline JC, Gerrard TL, Zoon KC (1991) Regulation of interferon production by human monocytes: requirements for priming for lipopolysaccharide-induced production. *J Leukoc Biol* 50, 176-181.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-9.
- Heinz S, Haehnel V, Karaghiosoff M, Schwarzfischer L, Muller M, Krause SW, Rehli M (2003) Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J Biol Chem* 278, 21502-21509.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., Akira, S. (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3, 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-5.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., Akira, S. (2004) The roles of two I κ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med*. 199, 1641-50.
- Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Kronke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA (1993) Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 365, 182-185.
- Henry T, Brotcke A, Weiss DS, Thompson LJ, Monack DM (2007) Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during *Francisella* infection. *J Exp Med* 204, 987-994.
- Henry T, Kirimanjeswara GS, Ruby T, Jones JW, Peng K, Perret M, Ho L, Sauer JD, Iwakura Y, Metzger DW, Monack DM (2010). Type I IFN signaling constrains IL-17A/F secretion by gammadelta T cells during bacterial infections. *J Immunol* 184, 3755-3767.
- Honda K, Takaoka A, Taniguchi T (2006) Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*. 25, 349-360.
- Hornig, T., Barton, G.M., Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2, 835-841.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-52.

- Hsu, L.C., Park, J.M., Zhang, K., Luo, J.L., Maeda, S., Kaufman, R.J., Eckmann, L., Guiney, D.G., Karin, M. (2004) The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature*. 428, 341-5.
- Huang X, Hutchins B, Patel RC (2002) The C-terminal, third conserved motif of the protein activator PACT plays an essential role in the activation of double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR). *Biochem J* 366, 175-186.
- Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, Bland KI, Chaudry IH (2005) Cecal ligation and puncture. *Shock* 24 Suppl 1, 52-57
- Hung JJ, Wang YT, Chang WC (2006) Sp1 deacetylation induced by phorbol ester recruits p300 to activate 12(S)-lipoxygenase gene transcription. *Mol Cell Biol* 26, 1770-1785.
- Isaacs, A., Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-67.
- Iwahori S, Shirata N, Kawaguchi Y, Weller SK, Sato Y, Kudoh A, Nakayama S, Isomura H, Tsurumi T (2007) Enhanced phosphorylation of transcription factor sp1 in response to herpes simplex virus type 1 infection is dependent on the ataxia telangiectasia-mutated protein. *J Virol* 81, 9653-9664.
- Janssens, S., Beyaert, R. (2003) Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* 11, 293-302.
- Johnsen IB, Nguyen TT, Bergstrom B, Lien E, Anthonsen MW (2012) Toll-like receptor 3-elicited MAPK activation induces stabilization of interferon-beta mRNA. *Cytokine* 57, 337-346.
- Jones, B.W., Heldwein, K.A., Means, T.K., Saukkonen, J.J., Fenton, M.J. (2001) Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis* 60 Suppl 3, iii6-12.
- Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51, 1079-1090.
- Karaghiosoff M, Steinborn R, Kovarik P, Kriegshauser G, Baccarini M, Donabauer B, Reichart U, Kolbe T, Bogdan C, Leanderson T, Levy D, Decker T, Muller M (2003) Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat Immunol* 4, 471-477.
- Karin M, Greten FR (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5, 749-759.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 11, 115-122.

- Kawai T, Akira S (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13, 816-825.
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.
- Kawai T, Akira S, (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13, 460-469.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P.F., Sato, S., Hoshino, K., Akira, S. (2001) Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol.* 167, 5887-94.
- Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Delano MJ, Weinstein JS, Cuenca AG, Wynn JL, Moldawer LL (2010) Type I interferon signaling in hematopoietic cells is required for survival in mouse polymicrobial sepsis by regulating CXCL10. *J Exp Med* 207, 319-326.
- Khoo JJ, Forster S, Mansell A (2011) Toll-like receptors as interferon-regulated genes and their role in disease. *J Interferon Cytokine Res* 31, 13-25.
- Ketloy C, Engering A, Srichairatanakul U, Limsalakpetch A, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, Ruxrungtham K (2008) Expression and function of Toll-like receptors on dendritic cells and other antigen presenting cells from non-human primates. *Vet Immunol Immunopathol* 125, 18-30.
- Kim J.I., Lee C.J., Jin M.S., Lee C.H., Paik S.G., Lee H., Lee J.O. (2005) Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem.*; 280: 11347-11351.
- Kingsley C, Winoto A (1992) Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12, 4251-4261.
- Kontsek, P., Karayianni-Vasconcelos, G., Kontsekova, E. (2003) The human interferon system: characterization and classification after discovery of novel members. *Acta Virol* 47, 201-15.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., Donnelly, R.P. (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4, 69-77.
- Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30, 16-34.
- Kuhen KL, Samuel CE (1998) Mechanism of interferon action: functional characterization of positive and negative regulatory domains that modulate transcriptional activation of the human RNA-dependent protein kinase Pkr promoter. *Virology.* 254, 182-195.

- Lackman R.L. e Cresswell P. (2006) Exposure of the promonocytic cell line THP-1 to *Escherichia coli* induces IFN-gamma-inducible lysosomal thiol reductase expression by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*; 280: 11347-11351.
- Laemmli UK, Paulson JR, Hitchins V (1974) Maturation of the head of bacteriophage T4. V. A possible DNA packaging mechanism: in vitro cleavage of the head proteins and the structure of the core of the polyhead. *J Supramol Struct.* 2, 276-301.
- Landsman L, Jung S (2007) Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 179, 3488-3494.
- Lanoix JP, Schmit JL, Douadi Y (2012) Bacterial lung sepsis in patients with febrile neutropenia. *Curr Opin Pulm Med* 18, 175-180.
- LaRue KE, McCall CE (1994) A labile transcriptional repressor modulates endotoxin tolerance. *J Exp Med* 180, 2269-2275.
- Lau, J.F., Horvath, C.M. (2002) Mechanisms of Type I interferon cell signaling and STAT-mediated transcriptional responses. *Mt Sinai J Med.* 69, 156-68.
- Lawrence T, Gilroy DW (2007) Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol* 88, 85-94.
- Lee ES, Yoon CH, Kim YS, Bae YS (2007) The double-strand RNA-dependent protein kinase PKR plays a significant role in a sustained ER stress-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 581, 4325-4332. Epub 2007 Aug 4314.
- Lee H.K., Dunzendorfer S., Soldau K., Tobias P.S. (2006) Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity*; 24:153-163.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-83.
- Levy DE, Marie I, Smith E, Prakash A (2002) Enhancement and diversification of IFN induction by IRF-7-mediated positive feedback. *J Interferon Cytokine Res* 22, 87-93.
- Levy, D.E., Garcia-Sastre, A. (2001) The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 143-56.
- Li P, Wong JJ, Sum C, Sin WX, Ng KQ, Koh MB, Chin KC (2011) IRF8 and IRF3 cooperatively regulate rapid interferon-beta induction in human blood monocytes. *Blood* 117, 2847-2854.

- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., Flavell, R.A. (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5598-603.
- Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, Kim TJ, Ye SK, Song MD, Kang H, Kim DW, Moon WK, Lee KH (2010) Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-kappaB and IFN-beta/STAT1 pathways in RAW264.7 cells. *Nitric Oxide* 23, 214-219.
- Mahieu T, Park JM, Revets H, Pasche B, Lengeling A, Staelens J, Wullaert A, Vanlaere I, Hochepped T, van Roy F, Karin M, Libert C (2006) The wild-derived inbred mouse strain SPRET/Ei is resistant to LPS and defective in IFN-beta production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2292-2297.
- Malcolm KC, Worthen GS (2003) Lipopolysaccharide stimulates p38-dependent induction of antiviral genes in neutrophils independently of paracrine factors. *J Biol Chem* 278, 15693-15701.
- Manavalan B, Basith S, Choi S (2011) Similar Structures but Different Roles - An Updated Perspective on TLR Structures. *Front Physiol* 2, 41.
- Mancuso G, Midiri A, Biondo C, Beninati C, Zummo S, Galbo R, Tomasello F, Gambuzza M, Macri G, Ruggeri A, Leanderson T, Teti G (2007) Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria. *J Immunol* 178, 3126-3133.
- Mantovani A, Sica A, Locati M (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23, 344-346.
- Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S (1997) Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89, 619-628.
- Matsumoto M, Seya T (2008) TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev* 60, 805-812.
- Mboko WP, Mounce BC, Wood BM, Kulinski JM, Corbett JA, Tarakanova VL (2012) Coordinate regulation of DNA damage and type I interferon responses imposes an antiviral state that attenuates mouse gammaherpesvirus type 68 replication in primary macrophages. *J Virol* 86, 6899-6912.
- McGettrick, A.F., O'Neill, L.A. (2010) Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol* 22, 20-27.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388, 394-7.

- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., Janeway, C.A., Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell.* 2, 253-8.
- Meeks KD, Sieve AN, Kolls JK, Ghilardi N, Berg RE (2009) IL-23 is required for protection against systemic infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 183, 8026-8034.
- Meylan E, Tschopp J (2006) Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell.* 22, 561-569.
- Michels J, Johnson PW, Packham G (2005) Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 267-271.
- Muta T., Takeshige K. (2001) Essential roles of CD14 and lipopolysaccharidebinding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur J Biochem*; 268: 4580-4589.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., Dixit, V.M. (1997) IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278, 1612-5.
- Nagarajan U (2011) Induction and function of IFNbeta during viral and bacterial infection. *Crit Rev Immunol* 31, 459-474.
- Nagarajan UM, Prantner D, Sikes JD, Andrews CW, Jr., Goodwin AM, Nagarajan S, Darville T (2008) Type I interferon signaling exacerbates *Chlamydia muridarum* genital infection in a murine model. *Infect Immun* 76, 4642-4648.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17-29.
- Nakata T, Yasuda M, Fujita M, Kataoka H, Kiura K, Sano H, Shibata K (2006) CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex. *Cell Microbiol* 8, 1899-1909.
- Nanduri, S., Rahman, F., Williams, B.R., Qin, J. (2000) A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *EMBO J* 19, 5567-5574.
- Nonato, M.C., Widom, J., Clardy, J. (2002) Crystal structure of the N-terminal segment of human eukaryotic translation initiation factor 2alpha. *J Biol Chem* 277, 17057-61.
- O'Connell RM, Saha SK, Vaidya SA, Bruhn KW, Miranda GA, Zarnegar B, Perry AK, Nguyen BO, Lane TF, Taniguchi T, Miller JF, Cheng G (2004) Type I

- interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* 200, 437-445.
- O'Dea E, Hoffmann A (2009) NF-kappaB signaling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1, 107-115.
- O'Mahony DS, Pham U, Iyer R, Hawn TR, Liles WC (2008) Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci* 5, 1-8.
- O'Neill, L.A. (2003) The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochem Soc Trans* 31, 643-7.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., Seya, T. (2003) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol.* 4, 161-7. Epub 2003 Jan 21.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., Aderem, A. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13766-71.
- Pain, V.M. (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 236, 747-71.
- Pan ZK, Fisher C, Li JD, Jiang Y, Huang S, Chen LY (2011) Bacterial LPS up-regulated TLR3 expression is critical for antiviral response in human monocytes: evidence for negative regulation by CYLD. *Int Immunol* 23, 357-364.
- Pando MP, Verma IM (2000) Signal-dependent and -independent degradation of free and NF-kappa B-bound I kappa Balpha. *J Biol Chem* 275, 21278-21286.
- Panniers, R., Henshaw, E.C. (1983) A GDP/GTP exchange factor essential for eukaryotic initiation factor 2 cycling in Ehrlich ascites tumor cells and its regulation by eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation. *J Biol Chem* 258, 7928-34.
- Parsons SA, Greer PA (2006) The Fps/Fes kinase regulates the inflammatory response to endotoxin through down-regulation of TLR4, NF-kappaB activation, and TNF-alpha secretion in macrophages. *J Leukoc Biol* 80, 1522-1528.
- Pereira, R.M., Teixeira, K.L., Barreto-de-Souza, V., Calegari-Silva, T.C., De-Melo, L.D., Soares, D.C., Bou-Habib, D.C., Silva, A.M., Saraiva, E.M., Lopes, U.G. (2010) Novel role for the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR: modulation of macrophage infection by the protozoan parasite *Leishmania*. *FASEB J* 24, 617-26.

- Peters GA, Hartmann R, Qin J, Sen GC (2001) Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Mol Cell Biol.* 21, 1908-1920.
- Pfeffer LM (2011) The role of nuclear factor kappaB in the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* 31, 553-559.
- Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, Gerritsen ME (1997) Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 272, 21096-21103.
- Pindel A, Sadler A (2011) The role of protein kinase R in the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* 31, 59-70.
- Platanias LC (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5, 375-386.
- Polderman KH, Girbes AR (2004) Drug intervention trials in sepsis: divergent results. *Lancet* 363, 1721-1723.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 282, 2085-8.
- Proud CG (2005) eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 16, 3-12.
- Qin Z (2011) The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 221, 2-11.
- Qiu H, Fan Y, Joyee AG, Wang S, Han X, Bai H, Jiao L, Van Rooijen N, Yang X (2008) Type I IFNs enhance susceptibility to *Chlamydia muridarum* lung infection by enhancing apoptosis of local macrophages. *J Immunol* 181, 2092-2102.
- Ramana CV, Grammatikakis N, Chernov M, Nguyen H, Goh KC, Williams BR, Stark GR (2000) Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. *EMBO Journal* 19, 263-272.
- Ramana KV, Srivastava SK (2006) Mediation of aldose reductase in lipopolysaccharide-induced inflammatory signals in mouse peritoneal macrophages. *Cytokine* 36, 115-122.
- Rao J, Zhang F, Donnelly RJ, Spector NL, Studzinski GP (1998) Truncation of Sp1 transcription factor by myeloblastin in undifferentiated HL60 cells. *J Cell Physiol* 175, 121-128.
- Resendes KK, Rosmarin AG (2004) Sp1 control of gene expression in myeloid cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 14, 171-181.

- Richez C, Yasuda K, Watkins AA, Akira S, Lafyatis R, van Seventer JM, Rifkin IR (2009) TLR4 ligands induce IFN-alpha production by mouse conventional dendritic cells and human monocytes after IFN-beta priming. *J Immunol* 182, 820-828.
- Rhoads RE (1993) Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors. *J Biol Chem* 268, 3017-3020.
- Saelens X, Kalai M, Vandenabeele P (2001) Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation. *J Biol Chem* 276, 41620-41628.
- Salomao R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Martos LS, Mendes ME, Gomes NE, Rigato O (2008) TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock* 30 Suppl 1, 73-77.
- Schlee, M., Hartmann, G. (2010) The chase for the RIG-I ligand--recent advances. *Mol Ther* 18, 1254-62.
- Schwende H., Fitzke E., Ambs P., Dieter P. (1996) Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol*; 59: 555-561.
- Sen R, Baltimore D (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716.
- Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND (2007) Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol* 8, 1.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F.J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D., Klucher, K.M. (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4, 63-8.
- Shi C, Pamer EG (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, 762-774.
- Siebenlist U, Brown K, Claudio E (2005) Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol* 5, 435-445.
- Siebenlist U, Brown K, Claudio E (2005) Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol* 5, 435-445.
- Silva, A.M., Whitmore, M., Xu, Z., Jiang, Z., Li, X., Williams, B.R. (2004) Protein kinase R (PKR) interacts with and activates mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) in response to double-stranded RNA stimulation. *J Biol Chem*. 279, 37670-6. Epub 2004 Jun 30.

- So EY, Ouchi T (2010) The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci* 6, 675-681.
- Sondarva G, Kundu CN, Mehrotra S, Mishra R, Rangasamy V, Sathyanarayana P, Ray RS, Rana B, Rana A (2010) TRAF2-MLK3 interaction is essential for TNF-alpha-induced MLK3 activation. *Cell Res* 20, 89-98.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R.G., Silverman, R.H., Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annual Review of Biochemistry* 67, 227-264.
- Takada Y, Ichikawa H, Pataer A, Swisher S, Aggarwal BB (2007) Genetic deletion of PKR abrogates TNF-induced activation of I κ B kinase, JNK, Akt and cell proliferation but potentiates p44/p42 MAPK and p38 MAPK activation. *Oncogene* 26, 1201-1212.
- Takashiba S., Van Dyke T.E., Amar S., Murayama Y., Soskolne A.W., Shapira L. (1999) Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor κ B. *Infect Immun*; 67: 5573-5578.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 21, 335-376. Epub 2001 Dec 2019.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 21, 335-76. Epub 2001 Dec 19.
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P.F., Akira, S. (2000) 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* 164, 554-7.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., Akira, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13, 933-40.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Takeda, K., Akira, S. (1999) TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene.* 231, 59-65.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., Akira, S. (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169, 10-4.
- Tanaka H, Samuel CE (1994) Mechanism of interferon action: structure of the mouse PKR gene encoding the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7995-7999.
- Tanaka H, Samuel CE (2000) Mouse interferon-inducible RNA-dependent protein kinase Pkr gene: cloning and sequence of the 5'-flanking region and

- functional identification of the minimal inducible promoter. *Gene*. 246, 373-382.
- Thomis DC, Samuel CE (1992) Mechanism of interferon action: autoregulation of RNA-dependent P1/eIF-2 alpha protein kinase (PKR) expression in transfected mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10837-10841.
- Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD (2011) NF-kappaB in Aging and Disease. *Aging Dis* 2, 449-465.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76, 4350-4354.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171-176
- Valledor AF, Borrás FE, Culléll-Young M, Celada A (1998) Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 63, 405-417.
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 166, 249-255.
- Vivarini Ade C, Pereira Rde M, Teixeira KL, Calegari-Silva TC, Bellio M, Laurenti MD, Corbett CE, Gomes CM, Soares RP, Silva AM, Silveira FT, Lopes UG (2011) Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. *FASEB J* 25, 4162-4173.
- Ward SV, Markle D, Das S, Samuel CE (2002) The promoter-proximal KCS element of the PKR kinase gene enhances transcription irrespective of orientation and position relative to the ISRE element and is functionally distinct from the KCS-like element of the ADAR deaminase Promoter. *J Interferon Cytokine Res*. 22, 891-898.
- Ward SV, Samuel CE (2002) Regulation of the interferon-inducible PKR kinase gene: the KCS element is a constitutive promoter element that functions in concert with the interferon-stimulated response element. *Virology*. 296, 136-146.
- Ward SV, Samuel CE (2003) The PKR kinase promoter binds both Sp1 and Sp3, but only Sp3 functions as part of the interferon-inducible complex with ISGF-3 proteins. *Virology*. 313, 553-566.
- Weighardt H, Kaiser-Moore S, Schlautkotter S, Rossmann-Bloek T, Schleicher U, Bogdan C, Holzmann B (2006) Type I IFN modulates host defense and late hyperinflammation in septic peritonitis. *J Immunol* 177, 5623-5630.

- Williams, B.R. (2001) Signal integration via PKR. *Sci STKE* 2001, RE2.
- Wong AH, Tam NW, Yang YL, Cuddihy AR, Li S, Kirchhoff S, Hauser H, Decker T, Koromilas AE (1997). Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways. *EMBO J* 16, 1291-1304.
- Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC (2012) The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res.*
- Xia MZ, Liang YL, Wang H, Chen X, Huang YY, Zhang ZH, Chen YH, Zhang C, Zhao M, Xu DX, Song LH (2012) Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *J Pineal Res.*
- Xu Z, Williams BR (1998) Genomic features of human PKR: alternative splicing and a polymorphic CGG repeat in the 5'-untranslated region. *J Interferon Cytokine Res* 18, 609-616.
- Xu, Z., Williams, B.R. (2000) The B56alpha regulatory subunit of protein phosphatase 2A is a target for regulation by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Mol Cell Biol* 20, 5285-5299.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 301, 640-3. Epub 2003 Jul 10.
- Yamashita M, Fatyol K, Jin C, Wang X, Liu Z, Zhang YE (2008) TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell* 31, 918-924.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., Sher, A. (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-9.
- Yee M, Kim A, Alpagot T, Duzgunes N, Konopka K (2012) Porphyromonas gingivalis stimulates IL-18 secretion in human monocytic THP-1 cells. *Microbes Infect.*
- Yoon CH, Lee ES, Lim DS, Bae YS (2009) PKR, a p53 target gene, plays a crucial role in the tumor-suppressor function of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7852-7857.
- Yoshida K, Okamura H, Hoshino Y, Shono M, Yoshioka M, Hinode D, Yoshida H (2012) Interaction between PKR and PACT mediated by LPS-inducible NF-kappaB in human gingival cells. *J Cell Biochem* 113, 165-173.

- Zhang T, Lin RT, Li Y, Douglas SD, Maxcey C, Ho C, Lai JP, Wang YJ, Wan Q, Ho WZ (2005) Hepatitis C virus inhibits intracellular interferon alpha expression in human hepatic cell lines. *Hepatology* 42, 819-827.
- Zhang, D, Zhang, G, Hayden, MS, Greenblatt, MB, Bussey, C, Flavell, RA, Ghosh, S (2004) A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522-6.
- Zhang P, Jacobs BL, Samuel CE (2008) Loss of protein kinase PKR expression in human HeLa cells complements the vaccinia virus E3L deletion mutant phenotype by restoration of viral protein synthesis. *J Virol* 82, 840-848.
- Zhao W, Qi J, Wang L, Zhang M, Wang P, Gao C (2012) LY294002 inhibits TLR3/4-mediated IFN-beta production via inhibition of IRF3 activation with a PI3K-independent mechanism. *FEBS Lett* 586, 705-710.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-80.