

## 特约综述

# TLRs 与 RLRs 介导的细胞抗病毒 反应信号转导及其调节机制

张煜 钟波 杨艳 舒红兵\*

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

**摘要** Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)和RIG-I样受体(RIG-I like receptors, RLRs)为宿主细胞识别病毒的两种重要模式受体(pattern recognition receptors, PRRs)。前者定位于细胞膜组分,后者定位于胞浆,从而识别通过不同途径产生的病毒核酸,并通过招募特异接头蛋白,激活一系列信号级联反应,引发I型干扰素和促炎症细胞因子的产生。同时,宿主细胞通过各种方式调节TLRs和RLRs介导的信号通路,从而保证信号转导的稳态,并防止过度免疫反应对宿主造成伤害。此外,某些病毒也能通过其自身的结构蛋白或非结构蛋白,阻断TLRs和RLRs介导的信号通路,从而逃逸宿主对其识别与清除。本文将重点讨论TLRs和RLRs介导I型干扰素产生的信号转导及其调节机制,并简要介绍病毒对信号转导的调节。

**关键词** Toll样受体; RIG-I样受体; RNA病毒; 信号转导; 负调控

病原体入侵宿主,在其感染复制的过程中会产生一些保守组分,叫做病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs),这些PAMPs可被宿主细胞的模式识别受体(pathogen-recognition receptors, PRRs)识别,诱发一系列的信号级联反应。病毒侵入所产生的复制中间产物及病毒本身成份即构成被宿主PRRs所识别的PAMPs。迄今为止,已经定义了四种病毒PAMPs,包括双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)、5'三磷酸单链RNA(5' triphosphate single-stranded RNA, 5' pppssRNA)、非甲基化的2'-脱氧胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤核苷DNA(CpG-DNA)及包膜糖蛋白(envelope glycoproteins)<sup>[1]</sup>。宿主细胞的模式识别受体主要包括四类:Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)、RIG-I样受体(RIG-I like receptors, RLRs)和NOD样受体(NOD-like receptors, NLRs),以及最近发现的DNA受体DAI(DNA-dependent activator of interfereon-regulatory factors, DAI)[或称为ZBP1(Z-DNA binding protein 1)]和黑色素瘤缺乏因子2(absent in melanoma 2, AIM2)。其中TLRs和RLRs是两个研究最多的模式识别受体家族,也是识别病毒PAMPs的主要受体。TLRs和RLRs与其配体结合之后,构象发生改变,从而招募特异的位于细胞质的接头蛋白,激活信号级联反应,引起I

型干扰素(type I interferons, type I IFNs)、促炎症细胞因子(proinflammatory cytokines)、趋化因子(chemokines)等一系列抗病毒因子的产生。其中,I型干扰素与细胞膜表面的受体(IFN receptor, IFNR)结合,激活一系列基因的表达,包括Mx、ISGs、PKR等等。这些表达产物共同作用,抑制病毒的复制,引起被感染细胞的凋亡,并促进机体的适应性免疫,最终清除感染的病毒。相应地,宿主细胞为了防止过度的免疫反应,采取了一系列的策略来调节TLRs与RLRs介导的信号转导。病毒也进化出了各种机制来抑制TLRs与RLRs信号通路,从而逃逸宿主对其的免疫杀伤。本文即重点讨论TLRs与RLRs对病毒的识别及其介导的抗病毒天然免疫信号转导和调节机制。

## 1 TLRs与RLRs的结构与功能

### 1.1 TLRs的结构与功能

**1.1.1 TLRs的结构** TLRs是一类从线虫到哺乳动物都保守的模式识别受体。最早的Toll基因是在研究果蝇背腹极性时发现的<sup>[2]</sup>。后来的研究发现Toll在果蝇的天然免疫应答中扮演了重要角色<sup>[3]</sup>。

\* 通讯作者。Tel: 027-68753795; E-mail: shuh@whu.edu.cn

随后,人类和小鼠中先后克隆出多个*Toll*的同源蛋白,共同构成*Toll*样受体家族。目前为止,已经鉴定了至少13种TLRs,其中TLR1~TLR9是人类与老鼠所共有,TLR10似乎只在人类中有功能,而TLR11~TLR13为小鼠所特有<sup>[1]</sup>。

TLRs属于I型跨膜糖蛋白,由胞外区、跨膜区和胞质区组成。胞外区是由19~25个串联的富含亮氨酸的重复基序(leucine-rich repeat, LRR)形成的亮氨酸结构域,空间结构如马蹄型且高度保守,是识别和结合相应PAMPs的部位;跨膜区是富含半胱氨酸的区域,一般认为跨膜结构域决定了TLRs分子的亚细胞定位;胞质区和白介素-1受体(interleukin-1 receptor, IL-1R)家族的胞质区有高度同源性,称为TIR(Toll/IL-1R)结构域,负责与细胞内含有TIR结构域的接头蛋白分子相互作用,起始下游信号级联反应<sup>[4]</sup>。LRR具有长度的多样性从而识别不同的配体,而TIR结构域在不同种TLRs之间很保守,使不同种TLRs之间介导相似的信号通路。

**1.1.2 TLRs对病毒的识别** TLRs可据细胞内定位的不同被分为两个亚家族,即位于细胞膜表面的TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6和TLR11以及位于胞内膜组分(如胞内体、溶酶体或内质网膜)的TLR3、TLR7/8和TLR9<sup>[5]</sup>。由于定位的特点及自身结构的区别,它们所识别的PAMPs也相应存在差异。细胞膜表面的TLRs主要识别病原的膜成份。其中TLR2与TLR1或TLR6形成异源二聚体,分别识别细菌或支原体的三酰基脂肽和二酰基脂肽;TLR4识别革兰氏阴性菌的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)及某些病毒的包膜蛋白;TLR5识别细菌的鞭毛成分;TLR11识别一些尿道细菌<sup>[6]</sup>。而TLR3、TLR7/8、TLR9则主要识别经过自噬或内吞作用形成的胞质囊泡内的病毒核酸成分。下文将主要讨论在抗病毒免疫中发挥重要作用的TLR3、TLR7/8及TLR9(如表1所示)。

TLR3识别双链RNA病毒的基因组RNA,如呼吸弧病毒(reovirus),也识别单链RNA病毒的复制中间产物dsRNA,如西尼罗河病毒(west nile virus, WNV)、呼吸合胞体病毒(respiratory syncytial virus, RSV)和脑心肌炎病毒。此外,dsRNA的合成类似物polyI:C也可被TLR3所识别<sup>[7]</sup>。最近的研究显示,短干扰RNA(short interfering RNA, siRNA)也可以一种序列非依赖的方式结合TLR3并刺激IFN- $\gamma$ 和IL-12的产生<sup>[5]</sup>。然而,关于TLR3对病毒的识别,仍存在

争议。例如,对*Tlr3*<sup>-/-</sup>小鼠的研究表明TLR3对于识别小鼠巨细胞病毒(mouse cytomegalovirus, MCMV)、水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)及呼吸弧病毒是非必需的<sup>[8]</sup>。甚至还有研究显示TLR3对甲型流感病毒和西尼罗河病毒的识别,加快了病毒引起的病理进程而非免疫保护作用<sup>[9]</sup>。

人的浆样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)中大量表达TLR7/8和TLR9,并成为pDCs中识别病毒核酸的主要模式识别受体。静息状态下,它们主要定位于内质网,在受到病原体刺激后,可与内质网跨膜蛋白UNC93B1相互作用,并转移至胞内体膜上以识别相应的PAMPs<sup>[10]</sup>。早期研究认为TLR7/8识别一系列咪唑啉衍生物,如咪唑莫特R-837(imiquimod)、瑞喹莫特R-848(resiquimod)以及鸟嘌呤类似物loxoribine,这些物质均具有抗病毒或抗肿瘤的特性<sup>[11]</sup>。通过比较一系列咪唑啉与病毒核

**Table 1 Detection of pathogens by TLRs and RLRs**

PRRs	Pathogens	References
TLR3	Reovirus	[7]
	Encephalomyocarditis virus (EMCV)	[7]
	West nile virus (WNV)	[7]
	Respiratory syncytial virus (RSV)	[7]
	Short interfering RNA (siRNA)	[5]
	PolyI:C	[7]
TLR7/8	Imiquimod (R-837)	[11]
	Resiquimod (R-838)	[11]
	Loxoribine	[11]
	Human immunodeficiency virus (HIV)	[12]
	vesicular stomatitis virus (VSV)	[12]
	Influenza A virus (IAV)	[12]
TLR9	CpG-DNA motif	[13]
	mouse cytomegalovirus (MCMV)	[14]
	herpes simplex virus (HSV)	[14]
RIG-I	Influenza A virus (IAV)	[15,16]
	Vesicular stomatitis virus(VSV)	[15,16]
	Newcastle disease virus(NDV)	[15,16]
	Sendai virus (SeV)	[15,16]
	Japanese encephalitis virus (JEV)	[15,16]
	Hepatitis C virus (HCV)	[15,16]
	West Nile virus (WNV)	[15,16]
	Reovirus	[15,16]
	PolyI:C ( $\approx$ 1 kb)	[17]
	Respiratory syncytial virus (RSV)	[17]
MDA5	Encephalomyocarditis virus (EMCV)	[15,16]
	Theiler's encephalomyelitis virus	[15,16]
	Mengo virus	[15,16]
	PolyI:C ( $\approx$ 2 kb)	[17]

酸的结构特征, 科学家总结出 TLR7/8 的配体可能为 ssRNA, 尤其是富含鸟嘌呤和尿嘧啶的 ssRNA 或富含尿嘧啶的 ssRNA。随后的研究发现人的 TLR8 和小鼠的 TLR7 (TLR8 在小鼠中无功能) 可识别 RNA 病毒的 ssRNA, 包括人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、水泡性口炎病毒和甲型流感病毒, 导致 IFN- $\alpha$  的产生<sup>[12]</sup>。此外, 特定的 siRNA 也可被 TLR7/8 所识别。由 TLR7/8 所识别的 ssRNA 除了依赖于特异的核酸序列, 还受核酸修饰的影响。和未修饰 ssRNA 相比, 被修饰的 ssRNA 刺激 pDCs 产生的细胞因子更少<sup>[14]</sup>。

TLR9 主要识别细菌中的常见核酸组分——未甲基化的 CpG-DNA<sup>[13]</sup>。被 TLR9 识别的 CpG-DNA 可以分为两类: A/D 型和 B/K 型。A/D 型 CpG-DNA 可在 pDCs 的胞内体中停留, 从而刺激细胞产生大量的 I 型干扰素。而 B/K 型 CpG-DNA 却很快被转运至溶酶体并降解, 因此只能导致少量 I 型干扰素的产生, 但它刺激促炎症细胞因子表达的能力强于 A/D 型 CpG-DNA, 并可以在普通的树突状细胞 (conventional dendritic cells, cDCs) 中刺激细胞产生少量 IFN- $\beta$ <sup>[8,13]</sup>。此外, 一些含有 CpG-DNA 的 DNA 病毒也可被 TLR9 所识别, 如小鼠巨细胞病毒、I 型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus I, HSV-I)、HSV-II 和腺病毒 (adenovirus)<sup>[14]</sup>。目前, 还有科学家认为糖骨架才是 TLR9 的基本配体, 因为含有磷酸二脂的 2' 脱氧核糖寡聚体可以结合并激活 TLR9<sup>[7,18]</sup>。还有研究表明, TLR9 (很可能还有 TLR7) 转录后的剪切加工是其形成具有功能活性 TLR9 的前提。全长 TLR9 于内质网上合成, 随后进入高尔基体并在其中被蛋白酶在氨基酸 441~470 (aa 441~470) 之间进行切割, 被切割后的 TLR9 进入胞内体中。尽管全长的和加工后的 TLR9 均能结合配体, 但只有后者才能进行下游信号转导。这可能是 TLR9 防止识别自身核苷酸的一种策略<sup>[19,20]</sup>。

## 1.2 RLRs 的结构和功能

**1.2.1 RLRs 的结构** RLRs 属于含有 DExD/H 结构域的 RNA 解旋酶家族 (RNA helicase family)。目前已经鉴定出三个成员, 即视黄酸诱导基因 I (retinoic acid-induced gene I, RIG-I)、黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation associated gene 5, MDA5) 和 LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2)。2004 年, Yoneyama 等<sup>[21]</sup>发现 RIG-I 作为一种模式识别受体, 能结合 dsRNA 并激活下游的信号级联反应, 诱导 I 型干扰素的表达。随后 MDA5 和 LGP2

也被陆续定义。体外实验表明, RIG-I 能识别 5' 端突出或 3' 端突出且磷酸化的 dsRNA, 也能识别 5' 三磷酸 ssRNA。其由 925 个氨基酸残基组成, aa 1~242 为两个级联激活和招募结构域 (caspase activation and recruitment domain, CARD), 负责向下游传递信号; aa 243~734 为 RIG-I 的 DEAD 盒, 其中 aa 270 为结合 ATP 的关键位点, aa 272~734 为解旋酶结构域 (helicase domain)。RIG-I 的 ATP 活性可能与 RIG-I 激活时构象的改变有关, 但解旋酶活性则与 RIG-I 诱导 I 型干扰素表达的功能相独立<sup>[15]</sup>; aa 735~925 为 RIG-I 的 RNA 结合结构域 (RNA-binding domain) 和抑制结构域 (repressor domain, RD), 其中 aa 792~925 又被称为 C 末端结构域 (C-terminal domain, CTD), 具有 RNA 识别及信号抑制等功能<sup>[22]</sup>。

随着各种生化实验证据的积累以及最近 RIG-I C 端晶体结构的解析, Yoneyama 等<sup>[22]</sup>提出了 RIG-I 的激活机制模型: 在静息状态下, RIG-I 以单体的形式存在, CARD、ATPase 和 RNA 解旋酶结构域被其 C 端的 RD 所掩蔽, 蛋白处于非活性状态。病毒感染宿主后产生 PAMPs, RIG-I 的 CTD 识别并结合相应的 PAMPs (详见下文), 构象发生变化, 暴露出 ATPase 结构域。ATPase 结构域结合并水解 ATP, 使得 RIG-I 亲和病毒 RNA 的能力加强, 从而使 RIG-I 的 CARD 活化, 与下游含 CARD 的接头蛋白相互作用并向下游传递信号。

与 RIG-I 类似, MDA5 的 N 端也含有两个 CARD, 中部为 DExD/H 解旋酶结构, C 末端为 RD。也有观点认为, MDA5 没有 RD, 因为其 C 端并不抑制病毒诱导的 I 型干扰素的表达<sup>[15]</sup>。到目前为止, MDA5 识别病毒 RNA 与激活的机制还不清楚, 需要晶体结构上的直接证据。此外, 对 *Rig-I*<sup>-/-</sup> 和 *Mda5*<sup>-/-</sup> 的小鼠的研究表明 RIG-I 和 MDA5 分别介导不同类型的病毒诱发的信号转导, 暗示 MDA5 与 RIG-I 存在不同的病毒识别范围。

RLRs 家族的第三个成员是 LGP2。包括 N 端的 RNA 解旋酶结构域和 C 端的 RNA 结合结构域, 但没有 CARD。体外实验表明, LGP2 能抑制 RIG-I 和 MDA5 介导的 I 型干扰素的表达。但对 *Lgp2*<sup>-/-</sup> 小鼠的研究表明 LGP2 的敲除使得小鼠对 EMCV 易感, 而对 VSV 的抵抗力增强, 这说明 LGP2 对 EMCV 和 VSV 的感染分别起着正负调控的作用<sup>[23]</sup>。有趣的是, MDA5 识别并介导了 EMCV 所诱发的信号转导, 而 RIG-I 则识别并介导 VSV 诱发的信号转导, 这说明

LGP2 至少以两种不同的方式分别调节 RIG-I 和 MDA5 的活性。最近, Karl-Peter Hopfner 研究小组解析出 LGP2 的抑制结构域的晶体结构, 提出了 LGP2 对 RIG-I 及 MDA5 的调节模型, 即 dsRNA 结合至 LGP2 的 C 端及 DExH 盒, 从而竞争性抑制了 dsRNA 依赖的 RIG-I 的激活。而同时, 功能完全的 LGP2 可以与 MDA5 共同识别 dsRNA 以增强 MDA5 介导的信号转导<sup>[24]</sup>。

**1.2.2 RLRs 对病毒的识别** 相对于 TLRs, RLRs 定位于胞浆, 因此是识别胞浆中病毒 PAMPs 的主要受体。2006 年, Kato 等<sup>[16]</sup>发现与野生型相比, *Rig-I*<sup>-/-</sup> 小鼠胚胎成纤维细胞 (*Rig-I*<sup>-/-</sup> MEFs) 被新城疫病毒 (newcastle disease virus, NDV)、仙台病毒 (sendai virus, SeV)、VSV、甲型流感病毒以及日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 感染后产生的 IFN- $\beta$  和 IL-6 等炎症因子大大降低, 相反, *Mda5*<sup>-/-</sup> MEFs 被这些病毒感染后产生的 IFN- $\beta$  并未受到影响。*Mda5*<sup>-/-</sup> MEFs 被小 RNA 病毒属的病毒如 EMCV、脑脊髓炎病毒 (Theiler's encephalomyelitis virus)、门戈病毒 (Mengo virus) 感染后几乎不产生干扰素, 而 *Rig-I*<sup>-/-</sup> MEFs 被这些病毒感染后干扰素表达并未受到大的影响。相应地, *Rig-I*<sup>-/-</sup> 以及 *Mda5*<sup>-/-</sup> 小鼠分别对 VSV 和 EMCV 易感, 这表明 RIG-I 和 MDA5 有着不同的病毒识别范围<sup>[15,16]</sup>。此外, polyI:C 也可被 RIG-I 及 MDA5 所识别, 其中 RIG-I 识别相对短的 polyI:C ( $\approx 1$  kb), 而 MDA5 识别相对长的 polyI:C ( $\approx 2$  kb)<sup>[17]</sup>。与之一致, RIG-I 与 MDA5 对病毒的识别与病毒所产生的 dsRNA 的长度有关: RIG-I 识别 RNA 长度较短 (约为 1.2~1.4 kb) 的 RNA 病毒, 而 MDA5 则识别 RNA 长度较长 (>3.4 kb) 的 RNA 病毒。对于一些能同时被 RIG-I 和 MDA5 识别的病毒来说, 其复制过程中产生的 dsRNA 决定了被哪一种 RLRs 识别, 例如 RIG-I 和 MDA5 对于双链 RNA 病毒——RSV 的识别依赖于其基因组 dsRNA 片段的长度<sup>[17]</sup>。

也有研究发现, 病毒在感染复制的过程中会产生 2',5' 连接的寡聚腺苷酸 (2',5'-linked oligoadenylate, 2-5A), 2-5A 能激活 RNase L, 从而剪切病毒或宿主自身的 RNA。RLRs 通过识别这些剪切产物而激活, 诱导一系列的信号级联反应, 促使 I 型干扰素的表达<sup>[25]</sup>。关于 LGP2 的配体识别, 有实验证明 LGP2 可与 dsRNA 相结合, 并且这种结合不依赖于 5' 三磷酸盐<sup>[24]</sup>。但关于 LGP2 具体识别哪些病毒及在抗病毒免疫通路中发挥何种功能, 仍有待进一步研究验证。

### 1.3 TLRs 与 RLRs 在不同类型细胞中的功能

TLRs 和 RLRs 有着不同的表达范围。TLRs 的表达谱较复杂。其中 TLR3 主要表达在子宫、肠道等的上皮细胞, 脑组织的星形胶质细胞、成胶质细胞, 成纤维细胞以及 cDCs 等<sup>[26]</sup>; TLR7/8 表达于 DCs、B 细胞、单核细胞、自然杀伤性细胞 (NK cell) 和 T 细胞; 人源 TLR9 仅在 B 细胞和 DCs 中表达, 鼠源 TLR9 在 B 细胞、单核细胞和巨噬细胞中均有表达<sup>[14]</sup>。与 TLRs 不同, RLRs 的组织表达较为简单, 它们在绝大多数组织的细胞中均低量表达, 例如心脏、肝脏、肾脏等。在病毒和干扰素的刺激下, RLRs 的表达会迅速上调<sup>[15]</sup>。

基因敲除小鼠实验证明这种 PRRs 功能的发挥也具有细胞特异性。*Myd88*<sup>-/-</sup>*Trif*<sup>-/-</sup> 小鼠中 TLRs 介导的信号转导被阻断, 用 NDV 刺激这种来源的 MEFs, IFN- $\beta$  及干扰素诱导基因 IP-10、RANTES、IL-6 的表达水平与野生型相当, 而用 NDV (或 VSV、SeV) 刺激 *Rig-I*<sup>-/-</sup> MEFs, 上述基因几乎不表达, 这说明 RIG-I 而非 TLRs 主要介导了非免疫细胞如 MEFs 通过诱导干扰素应答而清除病毒的过程<sup>[27]</sup>。类似的实验证明 cDCs 中 IFN- $\alpha$ 、IFN $\beta$  的产生也主要由 RIG-I 调控。反之, pDCs 中 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  的产生则主要由 TLRs 介导, 并且 TLR7 和 TLR9 发挥关键作用<sup>[27]</sup>。

既然 TLRs 与 RLRs 的功能具有细胞特异性, 那么在机体受到病毒入侵的时候这些细胞究竟扮演什么角色呢? Akira 等<sup>[28]</sup>证实, 小鼠在全身性感染 (systemic infection) 病毒后, pDCs 是产生 I 型干扰素的主要细胞, 巨噬细胞、cDCs 也能检测到干扰素的表达。在局部感染 (local infection) 病毒后, 位于感染部位的巨噬细胞和 cDCs 会通过 RLRs 介导的信号通路产生大量的 I 型干扰素, 最终清除感染部位的病毒。而在局部巨噬细胞和 cDCs 表达干扰素受阻或病毒由局部感染发展成为全身性感染的时候, pDCs 开始成为主要的 I 型干扰素表达细胞, 这种表达主要由 TLRs 介导。这说明系统与局部受到病毒感染后依赖于不同类型的细胞, 它们通过激活不同的 PRRs 和信号通路产生 I 型干扰素, 协同清除入侵的病毒<sup>[28]</sup>。

## 2 TLRs 与 RLRs 介导的信号转导

### 2.1 TLRs 与 RLRs 介导的下游事件——转录因子 NF- $\kappa$ B 和 IRF3/7 的激活

#### 2.1.1 转录因子 NF- $\kappa$ B 的激活机制概述 哺乳动

物的 NF- $\kappa$ B 家族蛋白包括五个成员: RelA (又称为 p65)、RelB、c-Rel、NF- $\kappa$ B1 (p50 及其前体 p105) 和 NF- $\kappa$ B2 (p52 及其前体 p100)。它们均含有一个高度保守的 Rel 同源结构域(Rel homology domain, RHD), 该结构域行使与 DNA 结合、蛋白二聚化以及与 I $\kappa$ B (inhibit  $\kappa$ B) 蛋白结合等功能。同时, RHD 还含有核定位信号序列(nuclear localization signal, NLS), 是活化的 NF- $\kappa$ B 进入细胞核所必需的<sup>[29]</sup>。在生理条件下, NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 相结合, 以非活性形式存在于细胞质中。I $\kappa$ B 家族主要包括 I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ 、I $\kappa$ B $\gamma$ 、I $\kappa$ B $\epsilon$ 、Bcl-3、p105、p100 以及果蝇蛋白 Catus 等。它们都含有五到七个保守的 ankyrin 重复序列, 这种序列可与 NF- $\kappa$ B 的 RHD 相结合, 掩蔽 NF- $\kappa$ B 的核定位信号序列, 阻止其入核<sup>[30]</sup>。

当细胞受到激活信号刺激时, I $\kappa$ B 的丝氨酸 32 和 36 位被上游激酶(详见下文)磷酸化, 使 I $\kappa$ B 被 E3 泛素连接酶 SCF- $\beta$ -TrCP 复合体识别并通过泛素-蛋白酶体途径降解。NF- $\kappa$ B 随即被释放出来并入核, 启动靶基因的转录。这种依赖于 I $\kappa$ B 降解的 NF- $\kappa$ B 激活方式也被称为 NF- $\kappa$ B 激活的经典途径(classical pathway)<sup>[31]</sup>; 除此之外, NF- $\kappa$ B 还可以通过非经典途径(non-classical pathway)激活。静息状态时, p100 与 RelB 结合, 构成 NF- $\kappa$ B 的非活性形式, 当上游激酶对 p100 进行磷酸化修饰后, p100 被 E3 泛素连接酶识别并通过蛋白酶体被降解成 p52, 与结合在一起的 RelB 一起形成 NF- $\kappa$ B 的活性形式即 52:RelB 并入核。这种依赖于 p100 降解而激活 NF- $\kappa$ B 的途径被称为 NF- $\kappa$ B 激活的非经典途径<sup>[32]</sup>。在 TLRs/RLRs 信号通路中, NF- $\kappa$ B 主要通过经典途径被激活。

I $\kappa$ B 和 p100 的磷酸化修饰均依赖于上游的 I $\kappa$ B 激酶复合体(I $\kappa$ B kinase, IKK)。这个复合体由具有激酶活性的催化亚基 IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  以及不具有激酶活性的调节亚基 NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) (又称为 IKK $\gamma$ ) 组成。其中 IKK $\beta$  是 IKK 复合体中的主要催化亚基, 在经典的 NF- $\kappa$ B 激活途径中发挥主要作用; IKK $\alpha$  介导激酶 NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase, NIK) 对 p100 的磷酸化, 从而参与非经典通路<sup>[33]</sup>; NEMO 在 NF- $\kappa$ B 激活的经典途径中负责将 IKK 复合物的催化亚基与上游信号通路联系起来, 而在 IKK $\alpha$  依赖的非经典信号途径中则不需要<sup>[34]</sup>。

**2.1.2 转录因子 IRF3/7 的激活机制概述** 干扰素调节因子(interferon regulatory factor, IRF)是一个分布极广的转录因子家族, 目前已知在哺乳动物细胞中的

IRFs 有 9 个, 即 IRF1~IRF9<sup>[35]</sup>。IRFs 的 N 端为保守的 DNA 结合区域, 可与许多干扰素诱导基因(IFN-stimulated genes, ISGs)启动子区的干扰素刺激反应元件(IFN stimulated response element, ISRE)结合; 除 IRF1 和 IRF2 外, 其他 IRFs C 端都有 IRF 相关区域(IRF association domain, IAD), 介导 IRFs 与同家族其他成员或其他转录因子相互作用, 以形成同源或异源二聚体<sup>[36]</sup>。

在 IRFs 中, IRF3/7 被认为在 TLRs/RLRs 诱导的 I 型干扰素表达的过程中发挥关键作用(详见下文)。IRF3 以非活性形式在细胞质中组成性表达, 在上游信号刺激下, IRF3 在上游激酶(详见下文)的激活下 C 端发生二步磷酸化。首先, IRF3 的丝氨酸和苏氨酸 396~405 位发生磷酸化, 使其与环状 AMP 应答元件结合蛋白[cyclic-AMP responsive element (CREB) -binding protein, CBP]相互作用, CBP 能促进 IRF3 的丝氨酸 385 位或丝氨酸 286 位发生磷酸化, 使得 IRF3 形成二聚体并被彻底激活<sup>[37]</sup>。与 IRF3 不同, IRF7 仅在 B 细胞和 DCs 中持续表达, 在其他细胞中, IRF7 在病毒或 IFNs 的诱导下才表达<sup>[38]</sup>。因此, IRF7 属于 IFNs 诱导的正反馈分子, 参与了晚期放大的 I 型干扰素(包括 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$ )的产生<sup>[39]</sup>。同样地, 上游激酶使 IRF7 的丝氨酸 477 位和 479 位发生磷酸化而激活<sup>[40]</sup>。

TANK 结合激酶 1 [TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK) -binding kinase 1, TBK1] 和 IKK $\epsilon$  是磷酸化 IRF3/7 的主要激酶。TBK1 又称为 NAK 或 TNFR 相关因子 2 相关激酶(TNFR-associated factor 2-associated kinase, T2K), IKK $\epsilon$  又称为 IKKi; TBK1 和 IKK $\epsilon$  在氨基酸序列上有 64% 的同源性, 在激活 IRF3/7 的过程中也行使类似的功能。但不同的是 TBK1 持续性表达于各种细胞, 如 MEFs, 而 IKK $\epsilon$  主要表达于 T 细胞、外周血细胞和骨髓来源的巨噬细胞, 在其他类型细胞中只有在如 LPS、TNF 和病毒等因素的刺激下才表达<sup>[41]</sup>。Tbk1<sup>-/-</sup> MEFs 在 TLR3/4 配体刺激后 IRF3 的激活、I 型干扰素及 ISGs 的产生都受到严重抑制, 表明 TBK1 是 IRF3 活化信号通路中主要的激酶<sup>[42]</sup>; 而相反, Ikke<sup>-/-</sup> MEFs 在上述刺激后, IRF3 的激活、I 型干扰素及 ISGs 的产生水平与野生型类似; 然而, Tbk1<sup>-/-</sup>Ikke<sup>-/-</sup> MEFs 中 I 型干扰素及其诱导表达的基因在 dsRNA 刺激后都不再表达。这说明 TBK1 是 TLRs/RLRs 中介导 IRF3 激活及 IFNs 应答的关键分子, 而 IKK $\epsilon$  在一些类型的细胞中与其功能冗余<sup>[41,43]</sup>。有趣的是, pDCs 中, IRF7 的磷酸化

激活通过独立于TBK1/IKK $\epsilon$ 的途径进行。这将在下文中重点阐述。

磷酸化的IRF3/7以同源或异源二聚体形式入核,结合于IFN或ISGs启动子区的ISRE上,与转录因子NF- $\kappa$ B、激活蛋白1(activator protein 1, AP1)一起诱导I型干扰素等靶基因的表达。现在一般认为,IRF3(和低表达的IRF7)主要参与了病毒感染早期I型干扰素的表达,而IRF7则主要调控了病毒感染后期I型干扰素的表达<sup>[35]</sup>。

## 2.2 TLRs介导的信号转导

在与配体结合之后,TLRs在膜上形成同源或异源二聚体,胞内构象发生改变,从而招募下游接头蛋白分子。目前鉴定出五种TLRs下游含TIR结构域的接头蛋白分子:MyD88(myeloid differentiation factor-88)、TRIF(TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ )/TICAM-1(TIR domain-containing adaptor Molecule 1)、Mal(MyD88 adaptor-like protein)/TIRAP(TIR domain-containing adaptor protein)、TRAM(TRIF-related adaptor molecules)/TICAM-2(TIR domain-containing adaptor molecule 2)、SARM(sterile a and heat-armoradillo motifs)。不同的TLRs利用不同或相同的接头蛋白向下转导信号。其中与病毒识别相关的TLRs(TLR3、TLR7/8、TLR9),只有TLR3介导的是TRIF依赖型信号通路,而TLR7/8、TLR9介导的是MyD88依赖型信号通路,下面分别加以介绍。

**2.2.1 TLR3介导的信号转导** TLR3是唯一一个只依赖TRIF而不依赖MyD88向下游传递信号的TLR。TLR3信号通路能同时激活NF- $\kappa$ B、IRF3和AP-1,从而诱导I型干扰素和促炎症细胞因子的产生(如图1所示)。

研究显示,在静息状态下,TLR3与CD14形成异源二聚体,这种结构是polyI:C与TLR3的结合所必需的<sup>[44]</sup>。位于胞内体上的c-Src酪氨酸激酶也可与TLR3相互作用并促进dsRNA介导的TLR3的信号转导<sup>[45]</sup>。TLR3识别polyI:C后,随即通过其TIR结构域招募TRIF。TRIF通过其N端与肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor associated factor, TRAF6)相互作用<sup>[46]</sup>。TRAF6为一种含有环指结构域(ring finger domain)的E3泛素连接酶,可以与泛素结合酶13(ubiquitin-conjugation enzyme 13, Ubc13)、Uev1A(Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 isoform A)相互作用,一起催化TRAF6自身

和NEMO发生63位赖氨酸(K63)连接的多聚泛素化。TRAF6通过K63-连接的多聚泛素链招募由TGF- $\beta$ 激活激酶(TGF- $\beta$ -activated kinase 1, TAK1)和TAK1结合蛋白1/2/3(TAK1-binding protein 1/2/3, TAB1/2/3)组成的激酶复合体。这个复合体随后活化下游两条不同的信号途径。其一,TAK1激活IKK激酶复合体,以进一步激活NF- $\kappa$ B。其二,TAK1通过磷酸化MAP激酶的激酶(MAPKKs)中的两个成员MKK3和MKK6从而进一步磷酸化MAPK,MAPK随后磷酸化激活转录因子AP-1;入核的NF- $\kappa$ B和AP-1共同调节促炎症细胞因子的产生。除了招募TRAF6,TRIF也可通过招募蛋白激酶RIP1激活TAK1,从而介导类似的下游事件。

最近几年有研究表明,TRIF的N端除了招募TRAF6外,还以TRAF3和NAK相关蛋白1[NF- $\kappa$ B activating kinase(NAK)-associated protein 1, NAP1]为桥梁,招募TBK1/IKK $\epsilon$ ,从而进一步引起IRF3的磷酸化入核<sup>[47,48]</sup>。同时,磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)和其下游的激酶AKt对于IRF3的充分激活也有作用。

除了介导抗病毒免疫信号转导,TLR3介导的信号通路还与细胞凋亡的诱导相关。即与TRIF结合的RIP1除了介导NF- $\kappa$ B的激活外,还可以通过死亡结构域之间的同源结合招募接头蛋白FADD(Fas-associated protein with death domain),FADD又通过死亡效应结构域(death effector domain, DED)招募半胱氨酸蛋白酶procaspase-8,从而导致procaspase-8的自激活并起始细胞凋亡<sup>[13]</sup>。

**2.2.2 TLR7/8和TLR9介导的信号转导** TLR7/8和TLR9在pDCs中大量表达,并通过MyD88激活IRFs、AP-1、NF- $\kappa$ B等转录因子,以产生大量的I型干扰素和炎症细胞因子(如图1所示)。与其他细胞类型不同,pDCs中I型干扰素的产生完全依赖于MyD88而非TRIF,且IRF7而非IRF3在此过程中发挥重要功能。

在pDCs中,ssRNA(由TLR7/8识别)或CpG-DNA(由TLR9识别)刺激下,相应TLRs通过MyD88进一步招募IL-1受体相关激酶4(IL-1R-associated kinase, IRAK4)及TRAF6。TRAF6通过泛素化激活TAK1进一步激活NF- $\kappa$ B和AP-1;同时,在IRAK4下游,TRAF3与IRAK1、IKK $\alpha$ 以及骨桥蛋白(osteopontin, OPN)形成复合体,磷酸化并激活IRF7<sup>[35]</sup>。也有研究认为,PI3K也参与了pDCs中IRF7的激活及I型

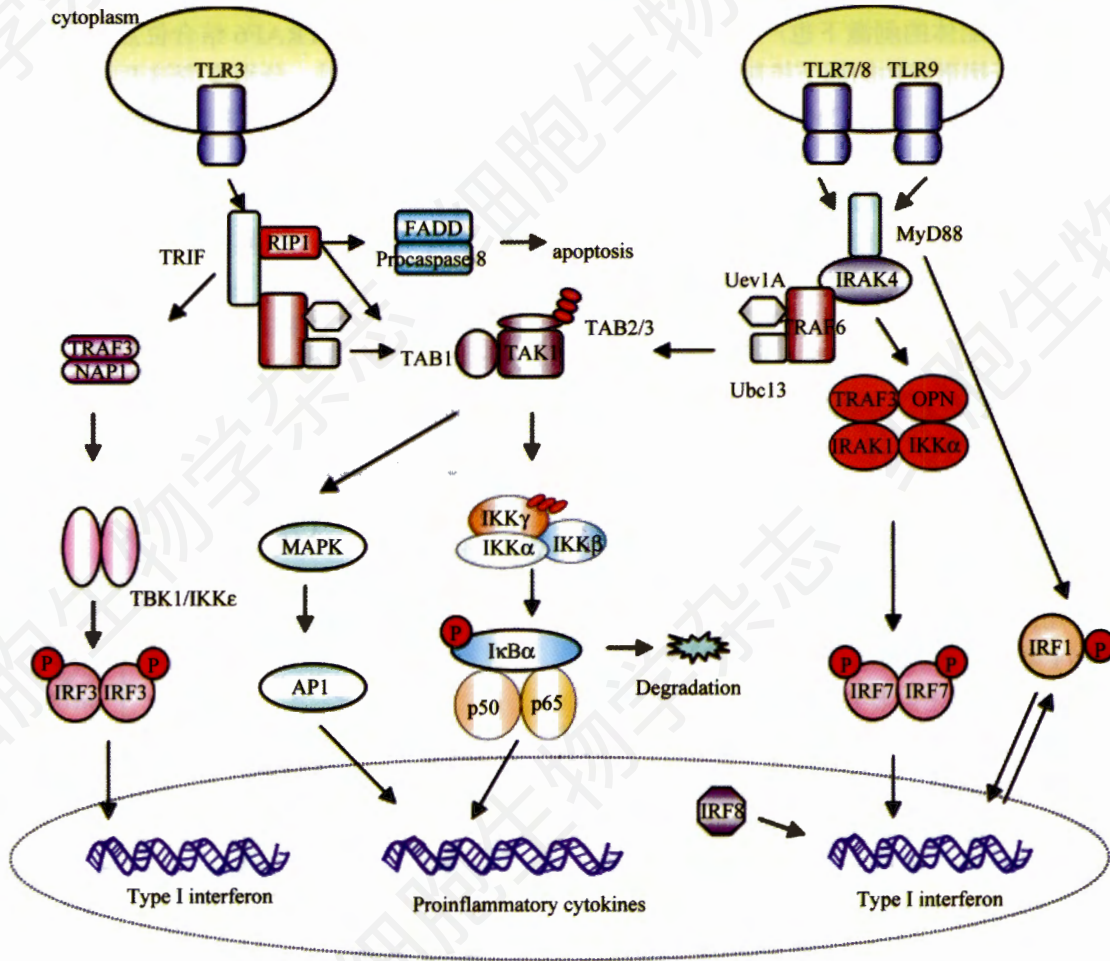


Fig.1 TLRs-mediated signaling

Upon stimulation, TLR3 recruits TRIF, which in turn recruits TRAF6 and RIP1 for activation of TAK1. TAK1, together with TABs (TAB1, TAB2, TAB3), subsequently activates the IKK complex composed of IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , NEMO/IKK $\gamma$  to catalyze phosphorylation of I $\kappa$ B. The phosphorylated I $\kappa$ B is ubiquitinated and degraded through the proteasome pathway, releasing NF- $\kappa$ B to translocate to the nucleus. TAK1 simultaneously activates the MAPK pathway. NF- $\kappa$ B and MAPK pathways control the expression of proinflammatory cytokines. TRIF also recruits TRAF3 and NAP1. TRAF3 in turn activates TBK1 or IKKe which phosphorylates and activates IRF3. Phosphorylated IRF3 forms homodimers and induce expression of type I IFN genes. The binding of RIP1 to TRIF not only activates NF- $\kappa$ B but also recruits FADD and procaspase 8, resulting in apoptosis. In pDCs, TLR7/8 and TLR9 are major antiviral PRRs. Upon stimulation by viral nucleic acids, these TLRs localize to the endosomes and recruit a signaling complex consisting of MyD88, IRAK4 and TRAF6, which in turn activates TAK1 and TRAF3. TAK1 mediates activation of NF- $\kappa$ B and MAPK, which leads to the induction of proinflammatory cytokine genes. TRAF3 activates IRAK1 and IKK $\alpha$ , which catalyze the phosphorylation of IRF7 and induce type I IFN genes. In cDCs, IRF1 is induced by IFN- $\gamma$  stimulation. After ligand stimulation, IRF1 interacts with MyD88 and translocates into the nucleus to induce the expression of IFN- $\beta$  and other genes. However, the mechanism of this process is currently unknown.

干扰素的产生<sup>[49]</sup>。最近研究发现,核内转录因子 IRF8 也参与了 TLR9 介导的信号通路。*Irf8*<sup>-/-</sup> DCs 在 CpG-DNA 的刺激下,几乎不能产生促炎症细胞因子, NF- $\kappa$ B 和 MAPK 的激活也严重受损。暗示 IRF8 在 NF- $\kappa$ B 的上游发挥作用<sup>[35]</sup>。此外, IRF8 也被认为参与了 DCs 中病毒刺激后晚期放大的 I 型干扰素的产生<sup>[50]</sup>。

*Irak1*<sup>-/-</sup> pDCs 中 TLR9 介导的 IRF7 的激活水平

及 IFN- $\alpha$  表达下降,但 NF- $\kappa$ B 的激活却表现正常,表明 IRAK1 特异性通过 IRF7 介导 IFN- $\alpha$  的产生<sup>[51]</sup>;与 IRAK1 不同, *Ikka*<sup>-/-</sup> 小鼠来源的 pDCs, TLR7 和 TLR9 信号通路中不仅 IRF7 的激活和 IFN- $\alpha$  的产生遭到破坏,而且 NF- $\kappa$ B 的激活和炎症细胞因子表达水平相对于野生型来说有所下降。这说明, IKK $\alpha$  不仅参与 TLR7 和 TLR9 信号通路中 IRF7 的激活,也参与了 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[35]</sup>。

cDCs 及巨噬细胞中也存在 TLR7/8 及 TLR9 的表达,且在相应的配体的刺激下也产生 I 型干扰素。但是其介导 I 型干扰素表达的调节机制与在 pDCs 中的机制不同。cDCs 在 B/K 型 CpG-DNA 的刺激下可产生少量的 IFN- $\beta$  而非 IFN- $\alpha$ 。研究表明,IRF1 而非 IRF3/7 特异性参与了这条通路<sup>[8]</sup>。IRF1 的表达可被 TLRs 配体或 IFN- $\gamma$  的刺激所诱导。在 *Irf1*<sup>-/-</sup> cDCs 中,TLR9 配体介导 IFN- $\gamma$  的产生遭到破坏,而 *Irf1*<sup>-/-</sup> pDCs 却表现正常。此外,IRF1 还可与 MyD88 相互作用。说明在 cDCs 中,IRF1 在受到 TLRs 配体或 IFN- $\gamma$  刺激下可大量表达,并在被上游激酶激活后入核引起 IFN- $\beta$  的表达<sup>[52]</sup>。

### 2.3 RLRs 介导的信号转导

上文提到,RIG-I 和 MDA5 识别相应的病毒核酸结构后,可发生二聚化并进一步寡聚化以和下游接头蛋白相互作用,激活 NF- $\kappa$ B 和 IRFs,最终诱导促炎症细胞因子和 I 型干扰素的表达(如图 2 所示)。研究证明,RIG-I 的完全激活还需要 E3 泛素连接酶 TRIM25 (tripartite motif protein 25)催化其发生赖氨酸 172 的 K63 位连接的泛素化<sup>[53]</sup>。此外,泛素连接酶环指结构域蛋白 135 (ring finger protein 135, RNF135)也被认为参与了 RIG-I 的泛素化并且正调控 RIG-I 的活性<sup>[54]</sup>。激活的受体随之通过其 CARD 招募下游接头蛋白 VISA<sup>[55]</sup>, [也称为 MAVS (mitochondrial antiviral signaling), IPS-1 (interferon- $\beta$  promoter stimulator 1) 或 Cardif (CARD adaptor inducing IFN- $\beta$ )]<sup>[56~58]</sup>。VISA 由 540 个氨基酸组成,N 端为一个 CARD,可和 RIG-I/MDA-5 的 CARD 相互作用;中间为富含脯氨酸的区域(proline-rich region, PRR),可与 TRAFs 相互作用;C 端为跨膜结构域(transmembrane domain, TM),可将 VISA 定位于线粒体外膜上。过去认为,C 端的缺失破坏了 VISA 的线粒体定位,从而使 VISA 激活 I 型干扰素的能力随之消失<sup>[58]</sup>。但最近有证据表明,VISA 在线粒体上通过其 C 端形成寡聚化,这种寡聚化而非 VISA 的线粒体定位是其向下游传递信号所必需的<sup>[59]</sup>。*Visa*<sup>-/-</sup> MEFs、cDCs 和巨噬细胞在仙台病毒(由 RIG-I 识别)和副粘病毒科病毒(由 MDA-5 识别)的刺激下,几乎不产生 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  和 IL-6,此外 *Visa*<sup>-/-</sup> 的细胞在 RNA 病毒感染后,并不能检测到 IRF3 和 NF- $\kappa$ B 的激活,这说明 VISA 作为 RLRs 下游的一个重要接头蛋白,通过激活 NF- $\kappa$ B 和 IRF3,引发 I 型干扰素和促炎症因子的产生<sup>[60,61]</sup>。

#### 2.3.1 RLRs 介导的 NF- $\kappa$ B 的激活 RLRs 招募

VISA 向下游传递信号,其中,VISA 通过一个 TRAF2 结合位点及两个 TRAF6 结合位点分别与 TRAF2 和 TRAF6 相互作用。分别突变这两种结合位点,导致 VISA 激活 NF- $\kappa$ B 的活性大大降低,而三个位点均突变后,VISA 则完全丧失了激活 NF- $\kappa$ B 的能力,在 *Traf6*<sup>-/-</sup> MEFs 中,VISA 不能有效激活 NF- $\kappa$ B。这说明 VISA 通过 TRAF2 和 TRAF6 激活 NF- $\kappa$ B<sup>[55]</sup>。除了 TRAF2/6,VISA 还可与 FADD 和 RIP1 相互作用,激活 NF- $\kappa$ B。FADD 和 RIP1 是一类具有死亡结构域的蛋白质,在 TNF 诱导 NF- $\kappa$ B 的激活的过程中起着重要的作用。最初研究者发现,*Fadd*<sup>-/-</sup> 和 *Rip1*<sup>-/-</sup> 小

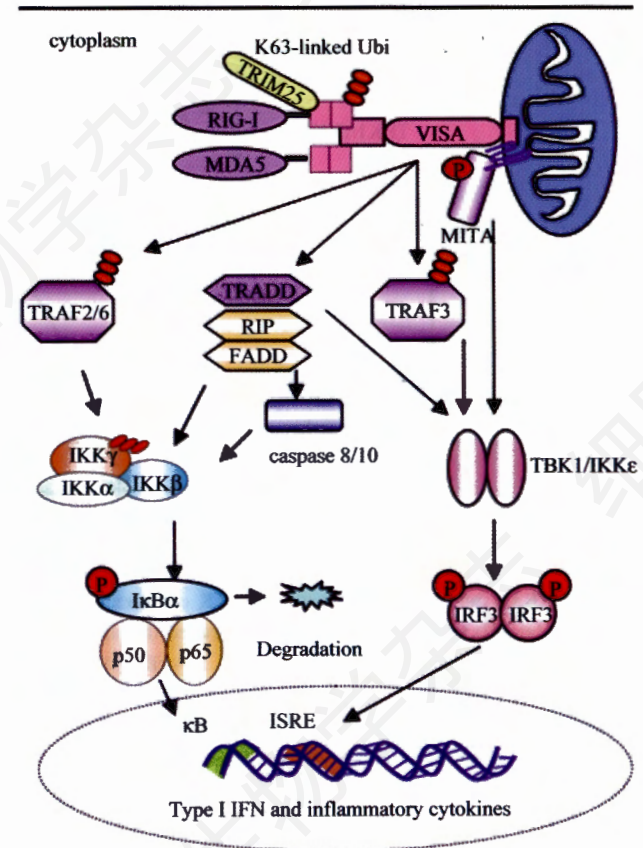


Fig.2 RLRs-mediated signaling

RIG-I and MDA5 are cytosolic PRRs. The binding of uncapped 5'triphosphate RNA or dsRNA to RIG-I/MDA5 induces the interaction between the RLRs and VISA. VISA is localized to the mitochondria, and recruits TRADD, which then forms a complex with FADD, caspase 8 and caspase 10 to activate NF- $\kappa$ B. TRAF2/6 is implicated in the activation of VISA-mediated NF- $\kappa$ B activation as well. TRADD also recruits TRAF3 to activate the TBK1/IKKε-IRF3 axis. MTA localizes to mitochondria and interacts with VISA and activates IRF3. Activated IRF3 and NF- $\kappa$ B then control the induction of inflammatory cytokine and type I IFN genes. TRIM25 is an E3 ligase which can activate RIG-I and facilitates VISA-mediated signaling.



鼠中在 dsRNA 的刺激下, I 型干扰素的产生受阻<sup>[62]</sup>。随后发现 FADD 和 RIP1 可与 VISA 相互作用, 并且过表达的 FADD 和 RIP1 可以特异性激活 NF- $\kappa$ B 而非 IRF3 的靶基因, 从而证明 FADD 和 RIP1 可以选择性参与到 dsRNA 诱导的 NF- $\kappa$ B 的激活过程中<sup>[56]</sup>。进一步研究证明另一种含有死亡结构域的蛋白 TRADD (TNFR-associated death-containing protein) 可与 FADD、RIP1、TANK、TRAF3 相互作用, 从而介导 NF- $\kappa$ B 和 IRF3 (详见下文) 的激活, 即 TRADD 可与 FADD/RIP1 一起激活 NF- $\kappa$ B, 并与 TRAF3/TANK 一起激活 IRF3, 但同时研究也表明 FADD 和 RIP1 似乎也参与了 IRF3 的激活, 因为 FADD 和 RIP1 的 siRNA 强烈的抑制了 RIG-I 介导的 ISRE 活性<sup>[63]</sup>。关于这两种实验结果的差异, 可能是因为 TRADD、FADD、RIP1 直接激活 NF- $\kappa$ B, 并可通过一定的分子交谈机制激活 IRF3, 但具体机制仍待进一步研究。除了 TRADD/RIP1, FADD 还可通过招募 caspase 8 和 caspase 10, 使它们发生剪切而被激活, 从而进一步激活 NF- $\kappa$ B<sup>[64]</sup>。此外, 也有研究认为 RIG-I 和 VISA 可与调节激活 NF- $\kappa$ B 非经典途径中的蛋白激酶 NIK 相互作用, 从而暗示 RLRs 也可通过非经典途径激活 NF- $\kappa$ B<sup>[65]</sup>, 但具体机制仍待研究。

**2.3.2 RLRs 介导的 IRFs 的激活** 除了 NF- $\kappa$ B 外, IRF3/7 也可被 RLRs 介导的信号通路所激活, 这种作用主要由 TBK1/IKK $\epsilon$  所介导。TRAF3 被认为招募 TBK1/IKK $\epsilon$  至 VISA, VISA 富含脯氨酸重复结构 (proline-rich repeat) 中含有 TRAF 结合结构 (TRAF-interaction motif, TIM), 可与 TRAF3 的 TRAF 结构域直接相互作用, 招募下游信号分子<sup>[66]</sup>。此外, TANK、NAP1、SINTBAD (similar to NAP1 TBK1 adaptor) 也可与 VISA、TRAF3 和 TBK1/IKK $\epsilon$  结合, 但它们是功能冗余, 还是在不同类型细胞中发挥不同的功能, 还需要进一步研究<sup>[15]</sup>。

最近我们还发现了另一个介导 RIG-I 诱导的 IRF3 激活的新接头蛋白, 称为 MITA (mediator of IRF3 activation), 它也被另外一个研究小组发现, 称为 STING (stimulator of interferon genes)。MITA 由 379 个氨基酸组成。C 端有四个跨膜结构域, 其中第三个 TM 将 MITA 锚定于线粒体膜上, MITA 的 N 端与 VISA 的 C 端存在持续的相互作用, 并以病毒依赖的方式招募 TBK1 至 VISA 从而激活 IRF3。相反, 内源 MITA 的敲除使病毒诱导下 IRF3 的激活及 IFN $\beta$ 1 和其他依赖于 IRF3 的下游基因的转录受到抑制。同

时, 虽然过表达 MITA 并不能激活 NF- $\kappa$ B, 但 MITA 的敲除却使 NF- $\kappa$ B 的激活减弱, 说明 MITA 有可能通过某种分子交谈的机制参与了 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[67]</sup>。但另外的研究表明 MITA 主要位于内质网上, 并可以和 RIG-I、VISA 和 TBK1 相互作用, 激活 IFN- $\beta$ 、IRF3 和 NF- $\kappa$ B<sup>[68]</sup>。进一步研究表明在病毒刺激后, MITA 存在由内质网至线粒体的穿梭, 这种穿梭与其功能的发挥及被 E3 泛素连接酶 RNF5 的泛素化降解相关 (详见下文)<sup>[69]</sup>。

### 3 TLRs 与 RLRs 信号通路的调控机制

TLRs/RLRs 在识别相应 PAMPs 后, 可通过诱导促炎症细胞因子及 I 型干扰素的产生, 引发下游炎症反应及抗病毒效应, 构成天然免疫中的重要组成部分。但是 TLRs/RLRs 信号通路的过度激活也会引发诸如自身免疫疾病和慢性炎症疾病等严重后果。机体为了避免这种情况对自身的伤害, 采取各种措施对信号通路进行负调节。此外, 一些病毒为了自身生存, 也通过各种策略负调节 TLRs/RLRs 信号通路, 以逃逸宿主对其识别与杀伤。下面我们介绍几种调节 TLRs/RLRs 信号通路的常见调节策略, 并分别举例说明 (如表 2、表 3 所示)。

#### 3.1 宿主细胞对 TLRs 与 RLRs 信号通路的调控机制

**3.1.1 策略一——降解关键的信号分子** 关键信号分子的降解是负调节信号通路的主要策略。这种降解作用主要通过泛素化作用来实现。泛素化需要三类蛋白酶——泛素激活酶 (ubiquitin-activated enzyme, E1)、泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2) 和泛素连接酶 (ubiquitin ligase, E3) 共同介导。其中 E3 是决定多聚泛素链与底物特异连接的主要分子。泛素分子上有 7 个保守的赖氨酸, 均可与靶蛋白相连, 介导泛素化的发生。其中 K48 连接的泛素化一般介导蛋白质发生依赖于蛋白酶体的降解。而 K63 连接的泛素化一般引起蛋白水解之外的蛋白功能的执行<sup>[70]</sup>。下面我们选择性地介绍一些介导关键信号分子降解的 E3。

Nrdp1 是一种最近被发现的 E3 泛素连接酶, 它可与 MyD88 相结合, 并对它进行 K48 泛素化而使其降解, 从而负调控 MyD88 依赖的 IRAK1、TAK1、IKK- $\beta$  和 MAPK 的激活。有趣的是, 其还可对 TBK1 进行 K63 泛素化以增强 TRIF 依赖的 TBK1 和 IRF3 的激活<sup>[71]</sup>; 细胞因子信号转导抑制因子 (suppressor of

Table 2 Cellular regulators of TLRs/RLRs signaling

Regulators	Type of negative regulation	Target(s)	Proposed mechanisms	References
Nrdp1	Inhibition of steady-state and activated state (TLRs)	MyD88, TBK1	Proteosomal degradation of MyD88, activation of TBK1	[71]
SOCS-1	Negative feedback (TLRs)	Mal, IRAK1	Proteosomal degradation of phosphorylated Mal	[72]
Trim30 $\alpha$	Negative feedback (TLRs)	TAB2, TAB3	Lysosome-related degradation of TAB2 and TAB3	[73]
RNF5	Negative feedback (RLRs)	MITA	Proteosomal degradation of MITA	[69]
Ro52/TRIM21	Negative feedback (TLRs/RLRs)	IRF3	Proteosomal degradation of IRF3	[74]
RNF125	Negative feedback (RLRs)	RIG-I,MDA5,VISA	Proteosomal degradation of targets	[75]
Triad3A	Inhibition of steady-state (TLRs)	TLR4, TLR9	Proteosomal degradation of certain TLRs	[76]
A20	Negative feedback (TLRs/RLRs)	RIP1, TRAF6, TRIF	Ubiquitination or deubiquitination of targets	[77,78]
RBCK1	Negative feedback (TLRs/RLRs)	TAB2/3, IRF3	Proteosomal degradation of targets	[79,80]
DUBA	Negative feedback (TLRs/RLRs)	TRAF3	Deubiquitination of TRAF3	[81]
CYLD	Inhibition of steady-state and activated state (TLRs/RLRs)	RIG-I, NEMO	Deubiquitination of targets	[82,83]
LGP2	Negative feedback (RLRs)	RIG-I, MDA5, VISA	Sequestration of RNA ligands from RIG-I or directly inhibit the self-dimerization of activated RIG-I, competition with IKKe for VISA	[15]
DAK	Inhibition of steady-state (RLRs)	MDA5	Sequestration of MDA5	[84]
NLRX1	Inhibition of steady-state (RLRs)	VISA	Competition with RLRs for VISA	[85,86]
SARM	Negative feedback (TLRs)	TRIF	Sequestration of TRIF	[87]
ISG56	Negative feedback (RLRs)	MITA	Sequestration of MITA	[88]
MyD88s	Negative feedback (TLRs)	IRAK1	Sequestration of IRAK1	[89]
RIG-I-SV	Negative feedback (RLRs)	RIG-I	Sequestration of TBK1	[90]
RP105	Inhibition of steady-state (TLRs)	TLR4	Sequestration of TLR4-MD2 from binding ligand	[91]
Atg5-Atg12	Inhibition of steady-state (RLRs)	RIG-I, MDA5, VISA	Sequestration the interaction between RLRs and VISA	[92]
gC1qR	Negative feedback (RLRs)	VISA	Sequestration of VISA	[93]
SIKE	Inhibition of steady-state (TLRs/RLRs)	TBK1, IKKe	Sequestration of targets	[94]
IRAK-M	Negative feedback (TLRs)	IRAK1	Inhibit the dissociation of IRAK1 from MyD88	[95]
IRF4	Negative feedback (TLRs)	IRF5	Competition with IRF5 for MyD88	[35]
SHP-2	Negative feedback (TLRs)	TBK1	Sequestration of TBK1	[96]
Pin1	Negative feedback (TLRs/RLRs)	IRF3	Phosphorylation-dependent isomerization	[97]
ISG15	Negative feedback (RLRs)	RIG-I	Inhibition of RIG-I	[98]
TRAF1	Negative feedback (TLRs)	TRIF	Cleavage of TRIF	[99]
NOD2	Not determined (TLRs)	NF- $\kappa$ B	Suppresses NF- $\kappa$ B	[100]
TRAILR	Inhibition of steady-state and activated state (TLRs/RLRs)	NF- $\kappa$ B	Stablization of I $\kappa$ B	[101]

cytokine signaling 1, SOCS-1)可与被 TLR2/4 招募的磷酸化 Mal 相互作用, 导致 Mal 发生多聚泛素化并被降解, 从而抑制 Mal 依赖的 NF- $\kappa$ B 入核, 最终降低促炎症细胞因子产生<sup>[72]</sup>; Trim30 $\alpha$  (tripartite-motif protein 30 $\alpha$ )也是一个含有环指结构域的 E3 泛素连接酶, 其表达依赖于 NF- $\kappa$ B 的激活, TRIM30 $\alpha$  的过表达可导致 TAB2 和 TAB3 的降解, 从而抑制由 TLRs 诱导的 NF- $\kappa$ B 的激活, 但特殊的是它对 TAB2/3 的降解并非通过蛋白酶体依赖途径, 而通过溶酶体依赖途径进行<sup>[73]</sup>; RNF5 为一个定位于线粒体和内质网的 E3 泛素连接酶, 病毒刺激后, 其可通过 C 端跨膜结构域与 MITA 的 C 端跨膜结构域相互作用, 并催化 MITA150 位赖

氨酸发生 K48 连接的泛素化进而降解, 由此抑制 RLRs 介导的信号转导<sup>[69]</sup>。当然, 除了这些蛋白, 胞内还存在许多其他的 E3 泛素连接酶如 Ro52/TRIM21、RNF125、triad3A (triad domain-containing protein 3)、A20、RBCK1 (RBCC protein interacting with PKC1) 等<sup>[74-80]</sup>, 它们也在 TLRs/RLRs 信号通路的调控过程中发挥重要功能。

3.1.2 策略二——调节信号分子的修饰 信号分子可被磷酸化或 K63 泛素化等修饰作用激活, 以正调控信号通路。反之, 去磷酸化与去泛素化等过程却往往参与信号通路的负调节。近年来, 去泛素化的负调控功能尤其受到重视。

Table 3 Viral inhibitors of TLRs/RLRs signaling

Virus	Inhibitors	Target(s)	References
Encephalomyocarditis virus	VPg	Viral RNA	[102,103]
Influenza A virus (IAV)	NS1	RIG-I	[103]
Poliovirus	Virus protease	MDA5	[104]
Rotavirus	NSP3	Viral RNA	[105]
Reovirus	$\delta 3$	Viral RNA	[106]
Vaccinia virus	E3L	Viral RNA	[107]
Hepatitis C virus	NS3/4A	VISA, TRIF	[108, 109]
Hepatitis A virus	3ABC	VISA	[110]
Human immunodeficiency virus	Vpr, Vif	IRF3	[111]
Pestivirus	N <sup>pro</sup>	IRF3	[111]
GBV-B	NS3/4A	VISA	[112]
Rotavirus	NSP1	IRF3	[113]
herpesvirus	RTA	IRF7	[111]
foot-and-mouth disease virus (FMDV)	L <sup>pro</sup>	NF- $\kappa$ B	[111]
SARS-covirus	PL <sup>pro</sup>	IRF3	[114]
Vaccinia virus	A52R	IRAK2, TRAF6	[115]
Vaccinia virus	A46R	MyD88, TRIF, Mal, TRAM	[116]
Hepatitis C virus	NS5A	MyD88	[117]
Ebola virus	VP35	RIG-I	[111]
Vaccinia virus	N1L	TBK1	[118]
Hepatitis C virus	NS3	TBK1	[119]
Vaccinia virus	K1L	NF- $\kappa$ B	[111]
Rabiesvirus	P	TBK1	[120]

去泛素化酶A (deubiquitinating enzyme A, DUBA) 是一个含有 OUT 结构域的去泛素化酶, 可选择性的降解 TRAF3 上的 K63 连接的泛素化链, 从而使 TRAF3 从含有 TBK1 的信号复合体上解离下来, DUBA 的过表达可抑制 RLRs 介导的 I 型干扰素的表达, 相反, DUBA 表达的下调有相反效应<sup>[81]</sup>; CYLD (cylindromatosis) 属于泛素特异性蛋白酶家族成员, 能去除多个分子的 K63 连接的泛素链, 如去除 RIG-I 的 K63 泛素化, 使 RIG-I 不能招募 VISA; 去除 NEMO 的泛素化, 使它从 TAK1/TAB2/TAB3 复合物中解离出来, 还可使 TRAF2/6/7 家族成员去泛素化<sup>[82,83]</sup>。

3.1.3 策略三——阻断分子间的相互作用 信号分子间的相互作用是信号转导的前提。而有些调节分子可以通过各种机制阻断这种相互作用, 从而负调信号通路。如在生理状态下将信号分子掩蔽起来以使其处于静息状态, 在通路激活时与其他信号分子竞争性结合靶蛋白等。

上文提到, 作为一种以信号调节为主要功能的 RLRs, LGP2 能以两种不同的机制分别调节 RIG-I 和 MDA5 的功能。此外, LGP2 的 C 端 RD 也可直接与 RIG-I 相互作用, 抑制其二聚化, 而 RIG-I 的二聚化被认为对其功能激活至关重要。同时, RIG-I 还可与 VISA 相互作用, 竞争性抑制 VISA 与 TBK1/IKK $\epsilon$  的相

互作用, 从而抑制 RLRs 介导的信号转导<sup>[15]</sup>; 二羟丙酮激酶(dihydroxyacetone kinase, DAK)只与 MDA5 而不与 RIG-I 相互作用, 在静息状态下, DAK 将 MDA5 掩蔽起来, 防止 MDA5 的持续激活, 而当病毒刺激下, DAK 与 MDA5 解离, 从而使 MDA5 与 VISA 结合, 有趣的是, DAK 只抑制 MDA5 介导的 IRF3 的激活, 而不影响 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[84]</sup>; NLRX1 是 NLR 家族成员, 其定位于线粒体外膜, 并通过 NBD 结构域与 VISA 的 CARD 相互作用, 竞争性抑制 RIG-I 与 VISA 的结合, 从而抑制 RLRs 介导的 IFN- $\beta$  的产生。但 IFN- $\beta$  的诱导却不能使其 mRNA 表达水平升高, 暗示 NLRX1 在细胞处于静息状态时起作用, 而非负反馈调节分子<sup>[85,86]</sup>; SARM 是 TLR3 和 TLR4 信号通路中的负调控蛋白, 在 TLR3 或 TLR4 配体的刺激下, SARM 表达上调, 并与 TRIF 相互作用, 从而特异性抑制 TRIF 下游转录因子激活及基因表达<sup>[87]</sup>; IFN 诱导基因 56 (IFN-stimulated gene 56, ISG56) 可在 IFNs 和多种病毒的刺激下产生, 并与 MITA 相结合, 过表达 ISG56 可抑制仙台病毒介导的 IRF3、NF- $\kappa$ B 和 IFN- $\beta$  的激活, 然而利用 RNAi 下调内源 ISG56 表达引起相反的效应, 竞争性免疫共沉淀实验表明, ISG56 可以破坏 MITA 和 VISA/TBK1 之间的相互作用, 从而发挥负调控功能<sup>[88]</sup>。此外, 还有一些分子也以类似的机制实现对 TLRs/RLRs 信号通

路的调控,如 MyD88s、RIG-I-SV (RIG-I splice variant)、PR105、Atg5-Atg12、gC1qR (receptor for globular head domain of complement C1q)、SIKE (suppressor of IKK $\epsilon$ )、IRAK-M、IRF4、SHP-2 (SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2)等<sup>[89-101]</sup>。

**3.1.4 其他策略** 除了上述三种常见策略,还有许多分子以其他策略发挥负调控功能,如肽基脯氨酰异构酶 Pin1 (prolyl isomerase 1)可以识别丝氨酸 339 磷酸化的 IRF3,并与其相互作用,引起 IRF3 构象改变并被某种 E3 泛素连接酶所识别并降解<sup>[97]</sup>。此外,还有许多负调控分子通过各种机制参与 TLR 和 RLR 信号通路的负调控,如 ISG15、TRAF1、NOD2、TIRAILR (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor)等<sup>[98-101]</sup>,共同维持 TLRs/RLRs 介导的信号转导的稳态。

## 3.2 病毒蛋白对 TLRs/RLRs 信号通路的调控机制

**3.2.1 逃逸 TLRs/RLRs 的识别** 微小 RNA 病毒科病毒 EMCV 的 vRNA 与一种小蛋白 VPg (virus proteins)共价结合,从而掩蔽了 5' 磷酸盐,使之逃逸了 RIG-I 的识别<sup>[102,103]</sup>;甲型流感病毒中的非结构蛋白 NS1 为一种病毒类似物,可与 RIG-I 相互作用,并抑制 RIG-I 介导的 IFN- $\beta$  的激活<sup>[103]</sup>。脊髓灰质炎病毒 (poliovirus)可以通过其基因组编码的两种蛋白酶以 caspase 和蛋白酶体依赖的方式水解 MDA5 从而抑制宿主的识别系统<sup>[104]</sup>。此外,痘苗病毒 (vaccinia virus)、呼吸弧病毒也以类似的方式逃逸宿主免疫系统的识别<sup>[105-107]</sup>。

**3.2.2 降解关键信号分子** HCV 编码的蛋白酶 NS3/4A (nonstructural protein 3/4A)具有丝氨酸蛋白酶活性,可通过水解 VISA C 端跨膜结构域的一段序列,使 VISA 不能在线粒体上发生寡聚化,进而使 IKK $\epsilon$  不能被招募至 VISA,从而影响 IFN- $\beta$  的表达<sup>[108,109]</sup>;与 NS3/4A 类似,甲型肝炎病毒 (hepatitis A virus, HAV) 的蛋白前体 3ABC 也能水解 VISA,将 VISA 的 CARD 和负责定位线粒体的跨膜结构域分开,阻断 IFN- $\beta$  的表达<sup>[110]</sup>;HIV 的非结构蛋白 Vpr 和 Vif 可引起 IRF3 依赖于蛋白酶体的降解<sup>[111]</sup>。此外,轮状病毒 (rotavirus)、疱疹病毒、GBV-B、口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus) 等病毒也以类似的机制负调控 TLRs/RLRs 信号通路<sup>[111-113]</sup>。

**3.2.3 调节信号分子的修饰** 造成严重急性呼吸器官综合症的冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome-coronavirus, SARS-Cov) 可以编码木瓜蛋白酶

样蛋白酶 (papain-like protease, PLpro), 这种酶能直接与 IRF3 相互作用,但这种作用并非为对 IRF3 的水解,在加入了磷酸酯酶抑制剂的实验中,PLpro 依然抑制 IRF3 的激活,说明也并非通过去磷酸化来实现。研究者推测 PLpro 与 IRF3 结合能降低 TBK1/IKK $\epsilon$  对 IRF3 的磷酸化<sup>[114]</sup>。

**3.2.4 阻断信号分子间的相互作用** 痘苗病毒编码的 A46R、A52R 为一类含有 TIR 结构域的蛋白质。其中 A46R 可通过 TIR 结构域与接头蛋白 MyD88、TRIF、Mal、TRAM 直接结合,从而抑制 TLRs 对这些蛋白的招募,阻断信号转导,而 A52R 可与 IRAK2 和 TRAF6 直接结合,破坏 IRAK2/Mal 及 TRAF/TAB1 信号复合体,从而抑制包括 TLR3 在内的多种 TLRs 所介导的 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[115,116]</sup>;Abe 等<sup>[117]</sup>发现 HCV 的非结构蛋白 NS5A 可通过 aa 237~276 的干扰素敏感性决定区 (interferon sensitivity determining region, ISDR) 与 MyD88 相互作用,并抑制 MyD88 对 IRAK1 的招募,从而抑制 MEFs 中 TLRs 配体诱导的促炎症细胞因子的产生。此外,埃博拉病毒 (Ebola virus)、呼吸弧病毒、丙肝病毒也可以类似的机制抑制 TLRs/RLRs 信号通路<sup>[111,118,119]</sup>。

当然,除了以上几种机制,许多病毒如还进化出其他的策略以保证自身大量复制,如:狂犬病毒、痘苗病毒等<sup>[111,120]</sup>。病毒通过多样化的方式突破宿主免疫系统的防御,同时也成为疾病治疗的重要靶点。

## 4 小结与展望

10年前,人们对病毒识别及随后 I 型干扰素和促炎症细胞因子产生的细胞生物学机制几乎一无所知。现在,大量关于 PRRs 介导的病毒核酸识别的分子机制及下游信号事件的研究方兴未艾。TLRs/RLRs 作为两种典型的识别病毒 RNA 的 PRRs,其涉及的分子事件已经比较清晰。现在,胞浆中的另一类识别病毒 DNA 的 PRRs——DAI/ZBP1 和 AIM2 的相关研究也在不断开展。当然,TLRs 与 RLRs 通路中仍存在许多未解决的问题。如 TLRs/RLRs 通路中是否还有其他未发现的新分子? TLRs/RLRs 介导的通路与 DNA 受体介导的通路又存在着怎么的分子交谈 (crosstalk)? 病毒感染的不同时期及病毒感染的不同方式会引起抗病毒通路怎样的协同或拮抗,并如何进一步诱导适应性免疫? 随着研究的深入,相信这些问题都会一一解决。

## 参考文献(References)

- [1] Thompson AJ, Locarnini SA. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response, *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(6): 435-445
- [2] Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein, *Cell*, 1988, 52(2): 269-279
- [3] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell*, 1996, 86(6): 973-983
- [4] Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition, *Int Immunol*, 2009, 21(4): 317-337
- [5] Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling, *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1143: 1-20
- [6] Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors, *Trends Mol Med*, 2007, 13(11): 460-469
- [7] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response, *Biochem J*, 2009, 420(1): 1-16
- [8] Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and Type I interferons, *J Biol Chem*, 2007, 282(21): 15319-15323
- [9] Wang T, Town T, Alexopoulou L, *et al.* Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis, *Nat Med*, 2004, 10(12): 1366-1373.
- [10] Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, *et al.* The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling, *J Cell Biol*, 2007, 177(2): 265-275
- [11] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, *et al.* Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway, *Nat Immunol*, 2002, 3(2): 196-200
- [12] Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling, *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(12): 911-922
- [13] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity, *Cell*, 2006, 124(4): 783-801
- [14] Bauer S, Pigisch S, Hangel D, *et al.* Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9, *Immunobiology*, 2008, 213(3-4): 315-328
- [15] Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors, *Immunol Rev*, 2009, 227(1): 54-65
- [16] Kato H, Takeuchi O, Sato S, *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses, *Nature*, 2006, 441(7089): 101-105
- [17] Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, *et al.* Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5, *J Exp Med*, 2008, 205(7): 1601-1610
- [18] Haas T, Metzger J, Schmitz F, *et al.* The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation, *Immunity*, 2008, 28(3): 315-323
- [19] Ewald SE, Lee BL, Lau L, *et al.* The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor, *Nature*, 2008, 456(7222): 658-662
- [20] Park B, Brinkmann MM, Spooner E, *et al.* Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9, *Nat Immunol*, 2008, 9(12): 1407-1414
- [21] Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses, *Nat Immunol*, 2004, 5(7): 730-737
- [22] Yoneyama M, Fujita T. Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors, *Immunity*, 2008, 29(2): 178-181
- [23] Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, *et al.* Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses, *J Immunol*, 2007, 178(10): 6444-6455
- [24] Pippig DA, Hellmuth JC, Cui S, *et al.* The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA, *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(6): 2014-25
- [25] Malathi K, Dong B, Gale M, Jr, *et al.* Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity, *Nature*, 2007, 448(7155): 816-819
- [26] Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3, *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21(1): 13-25
- [27] Kato H, Sato S, Yoneyama M, *et al.* Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response, *Immunity*, 2005, 23(1): 19-28
- [28] Kumagai Y, Takeuchi O, Kato H, *et al.* Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses, *Immunity*, 2007, 27(2): 240-252
- [29] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB, *Genes Dev*, 2004, 18(18): 2195-2224
- [30] Beg AA, Ruben SM, Scheinman RI, *et al.* I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappaB: a mechanism for cytoplasmic retention, *Genes Dev*, 1992, 6(10): 1899-1913
- [31] Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting, *Oncogene*, 2006, 25(51): 6887-6899
- [32] Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives, *Oncogene*, 2006, 25(51): 6680-6684
- [33] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity, *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 621-663
- [34] Dejardin E, Droin NM, Delhase M, *et al.* The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways, *Immunity*, 2002, 17(4): 525-535
- [35] Tamura T, Yanai H, Savitsky D, *et al.* The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis, *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 535-584
- [36] Hiscott J. Convergence of the NF-kappaB and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response, *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007, 18(5-6): 483-490
- [37] Hiscott J. Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation, *J Biol Chem*, 2007, 282(21): 15325-15329
- [38] Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors, *Immunity*, 2006, 25(3): 349-360
- [39] Kaisho T, Tanaka T. Turning NF-kappaB and IRFs on and off in DC, *Trends Immunol*, 2008, 29(7): 329-336
- [40] Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-

- related kinases, *Sci STKE*, 2006, (357): re13
- [41] Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, *et al.* The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection, *J Exp Med*, 2004, 199(12): 1641-1650
- [42] McWhirter SM, Fitzgerald KA, Rosains J, *et al.* IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1): 233-238
- [43] Perry AK, Chow EK, Goodnough JB, *et al.* Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection, *J Exp Med*, 2004, 199(12): 1651-1658
- [44] Lee HK, Dunzendorfer S, Soldau K, *et al.* Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14, *Immunity*, 2006, 24(2): 153-163
- [45] Johnsen IB, Nguyen TT, Ringdal M, *et al.* Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling, *EMBO J*, 2006, 25(14): 3335-3346
- [46] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling, *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(5): 353-364
- [47] Oganessian G, Saha SK, Guo B, *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response, *Nature*, 2006, 439(7073): 208-211
- [48] Sasai M, Oshiumi H, Matsumoto M, *et al.* Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation, *J Immunol*, 2005, 174(1): 27-30
- [49] Guiducci C, Ghirelli C, Marloie-Provost MA, *et al.* PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid dendritic cells in response to TLR activation, *J Exp Med*, 2008, 205(2): 315-322
- [50] Taylor P, Tamura T, Kong HJ, *et al.* The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8, *Immunity*, 2007, 27(2): 228-239
- [51] Gottipati S, Rao NL, Fung-Leung WP. IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity, *Cell Signal*, 2008, 20(2): 269-276
- [52] Negishi H, Fujita Y, Yanai H, *et al.* Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(41): 15136-15141
- [53] Gack MU, Shin YC, Joo CH, *et al.* TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity, *Nature*, 2007, 446(7138): 916-920
- [54] Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, *et al.* Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection, *J Biol Chem*, 2009, 284(2): 807-817
- [55] Xu LG, Wang YY, Han KJ, *et al.* VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling, *Mol Cell*, 2005, 19(6): 727-740
- [56] Kawai T, Takahashi K, Sato S, *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction, *Nat Immunol*, 2005, 6(10): 981-988
- [57] Meylan E, Curran J, Hofmann K, *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus, *Nature*, 2005, 437(7062): 1167-1172
- [58] Seth RB, Sun L, Ea CK, *et al.* Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3, *Cell*, 2005, 122(5): 669-682
- [59] Baril M, Racine ME, Penin F, *et al.* MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease, *J Virol*, 2009, 83(3): 1299-1311
- [60] Kumar H, Kawai T, Kato H, *et al.* Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses, *J Exp Med*, 2006, 203(7): 1795-1803
- [61] Sun Q, Sun L, Liu HH, *et al.* The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses, *Immunity*, 2006, 24(5): 633-642
- [62] Balachandran S, Thomas E, Barber GN. A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells, *Nature*, 2004, 432(7015): 401-405
- [63] Michallet MC, Meylan E, Ermolaeva MA, *et al.* TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway, *Immunity*, 2008, 28(5): 651-661
- [64] Takahashi K, Kawai T, Kumar H, *et al.* Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA, *J Immunol*, 2006, 176(8): 4520-4524
- [65] Liu P, Li K, Garofalo RP, *et al.* Respiratory syncytial virus induces RelA release from cytoplasmic 100-kDa NF-kappa B2 complexes via a novel retinoic acid-inducible gene-1/NF-kappa B-inducing kinase signaling pathway, *J Biol Chem*, 2008, 283(34): 23169-23178
- [66] Saha SK, Pietras EM, He JQ, *et al.* Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif, *EMBO J*, 2006, 25(14): 3257-3263
- [67] Zhong B, Yang Y, Li S, *et al.* The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation, *Immunity*, 2008, 29(4): 538-550
- [68] Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling, *Nature*, 2008, 455(7213): 674-678
- [69] Zhong B, Zhang L, Lei CQ, *et al.* The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA, *Immunity*, 2009, 30(3): 397-407
- [70] Bhoj VG, Chen ZJ. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity, *Nature*, 2009, 458(7237): 430-437
- [71] Wang C, Chen T, Zhang J, *et al.* The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 preferentially promotes TLR-mediated production of type I interferon, *Nat Immunol*, 2009, 10(7): 744-752
- [72] Mansell A, Smith R, Doyle SL, *et al.* Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation, *Nat Immunol*, 2006, 7(2): 148-155
- [73] Shi M, Deng W, Bi E, *et al.* TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation, *Nat Immunol*, 2008, 9(4): 369-377
- [74] Higgs R, Ni Gabhann J, Ben Larbi N, *et al.* The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation

- of IRF3, *J Immunol*, 2008, 181(3): 1780-1786
- [75] Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, *et al.* Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(18): 7500-7505
- [76] Chuang TH, Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors, *Nat Immunol*, 2004, 5(5): 495-502
- [77] Wang J, Hu Y, Deng WW, *et al.* Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway, *Microbes Infect*, 2009, 11(3): 321-327
- [78] Wang YY, Li L, Han KJ, *et al.* A20 is a potent inhibitor of TLR3- and Sendai virus-induced activation of NF-kappaB and ISRE and IFN-beta promoter, *FEBS Lett*, 2004, 576(1-2): 86-90
- [79] Tian Y, Zhang Y, Zhong B, *et al.* RBCK1 negatively regulates tumor necrosis factor- and interleukin-1-triggered NF-kappaB activation by targeting TAB2/3 for degradation, *J Biol Chem*, 2007, 282(23): 16776-16782
- [80] Zhang M, Tian Y, Wang RP, *et al.* Negative feedback regulation of cellular antiviral signaling by RBCK1-mediated degradation of IRF3, *Cell Res*, 2008, 18(11): 1096-1104
- [81] Kayagaki N, Phung Q, Chan S, *et al.* DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production, *Science*, 2007, 318(5856): 1628-1632
- [82] Friedman CS, O'Donnell MA, Legarda-Addison D, *et al.* The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response, *EMBO Rep*, 2008, 9(9): 930-936
- [83] Zhang M, Wu X, Lee AJ, *et al.* Regulation of IkappaB kinase-related kinases and antiviral responses by tumor suppressor CYLD, *J Biol Chem*, 2008, 283(27): 18621-18626
- [84] Diao F, Li S, Tian Y, *et al.* Negative regulation of MDA5- but not RIG-I-mediated innate antiviral signaling by the dihydroxyacetone kinase, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(28): 11706-11711
- [85] Komuro A, Bamming D, Horvath CM. Negative regulation of cytoplasmic RNA-mediated antiviral signaling, *Cytokine*, 2008, 43(3): 350-358
- [86] Moore CB, Bergstralh DT, Duncan JA, *et al.* NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity, *Nature*, 2008, 451(7178): 573-577
- [87] Carty M, Goodbody R, Schroder M, *et al.* The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling, *Nat Immunol*, 2006, 7(10): 1074-1081
- [88] Li Y, Li C, Xue P, *et al.* ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(19): 7945-7950
- [89] Burns K, Janssens S, Brissoni B, *et al.* Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4, *J Exp Med*, 2003, 197(2): 263-268
- [90] Gack MU, Kirchhofer A, Shin YC, *et al.* Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(43): 16743-16748
- [91] Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, *et al.* Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105, *Nat Immunol*, 2005, 6(6): 571-578
- [92] Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, *et al.* The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(35): 14050-14055
- [93] Xu L, Xiao N, Liu F, *et al.* Inhibition of RIG-I and MDA5-dependent antiviral response by gC1qR at mitochondria, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(5): 1530-1535
- [94] Huang J, Liu T, Xu LG, *et al.* SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF-3 activation pathways, *EMBO J*, 2005, 24(23): 4018-4028
- [95] Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, *et al.* IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling, *Cell*, 2002, 110(2): 191-202
- [96] An H, Zhao W, Hou J, *et al.* SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production, *Immunity*, 2006, 25(6): 919-928
- [97] Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, *et al.* Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1, *Nat Immunol*, 2006, 7(6): 598-605
- [98] Kim MJ, Hwang SY, Imaizumi T, *et al.* Negative feedback regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by interferon-induced ISG15 conjugation, *J Virol*, 2008, 82(3): 1474-1483
- [99] Su X, Li S, Meng M, *et al.* TNF receptor-associated factor-1 (TRAF1) negatively regulates Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF)-mediated signaling, *Eur J Immunol*, 2006, 36(1): 199-206
- [100] Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, *et al.* NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses, *Nat Immunol*, 2004, 5(8): 800-808
- [101] Diehl GE, Yue HH, Hsieh K, *et al.* TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses, *Immunity*, 2004, 21(6): 877-889
- [102] Hornung V, Ellegast J, Kim S, *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I, *Science*, 2006, 314(5801): 994-997
- [103] Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates, *Science*, 2006, 314(5801): 997-1001
- [104] Barral PM, Morrison JM, Drahos J, *et al.* MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells, *J Virol*, 2007, 81(8): 3677-3684
- [105] Langland JO, Pettiford S, Jiang B, *et al.* Products of the porcine group C rotavirus NSP3 gene bind specifically to double-stranded RNA and inhibit activation of the interferon-induced protein kinase PKR, *J Virol*, 1994, 68(6): 3821-3829
- [106] Olland AM, Jane-Valbuena J, Schiff LA, *et al.* Structure of the reovirus outer capsid and dsRNA-binding protein sigma3 at 1.8 Å resolution, *EMBO J*, 2001, 20(5): 979-989
- [107] Xiang Y, Condit RC, Vijaysri S, *et al.* Blockade of interferon induction and action by the E3L double-stranded RNA binding proteins of vaccinia virus, *J Virol*, 2002, 76(10): 5251-5259
- [108] Lin R, Lacoste J, Nakhaei P, *et al.* Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage, *J Virol*, 2006, 80(12): 6072-6083
- [109] Loo YM, Owen DM, Li K, *et al.* Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus

- infection, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(15): 6001-6006
- [110] Yang Y, Liang Y, Qu L, *et al.* Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(17): 7253-7258
- [111] Roy CR, Mocarski ES. Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity, *Nat Immunol*, 2007, 8(11): 1179-1187
- [112] Chen Z, Benureau Y, Rijnbrand R, *et al.* GB virus B disrupts RIG-I signaling by NS3/4A-mediated cleavage of the adaptor protein MAVS, *J Virol*, 2007, 81(2): 964-976
- [113] Graff JW, Ewen J, Ettayebi K, *et al.* Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability, *J Gen Virol*, 2007, 88(Pt 2): 613-620
- [114] Devaraj SG, Wang N, Chen Z, *et al.* Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus, *J Biol Chem*, 2007, 282(44): 32208-32221
- [115] Harte MT, Haga IR, Maloney G, *et al.* The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense, *J Exp Med*, 2003, 197(3): 343-351
- [116] Stack J, Haga IR, Schroder M, *et al.* Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence, *J Exp Med*, 2005, 201(6): 1007-1018
- [117] Abe T, Kaname Y, Hamamoto I, *et al.* Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines, *J Virol*, 2007, 81(17): 8953-8966
- [118] DiPerna G, Stack J, Bowie AG, *et al.* Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors, *J Biol Chem*, 2004, 279(35): 36570-36578
- [119] Otsuka M, Kato N, Moriyama M, *et al.* Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses, *Hepatology*, 2005, 41(5): 1004-1012
- [120] Brzozka K, Finke S, Conzelmann KK. Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3, *J Virol*, 2005, 79(12): 7673-7681

## Mechanisms and Regulations of TLRs- and RLRs-mediated Cellular Antiviral Signaling

Yu Zhang, Bo Zhong, Yan Yang, Hong-Bing Shu\*

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract** Toll-like receptors (TLRs) and RIG-I like receptors (RLRs) are two classes of pattern recognition receptors (PRRs) in host cells. TLRs are located at the membrane system of cells, while the RLRs are cytoplasmic viral sensors. Upon recognition of the PAMPs generated by viruses during their invasion and replication, TLRs and RLRs recruit various of adaptors and activate a series of signaling cascades, leading to induction of type I interferons (IFNs) and proinflammatory cytokines. Meanwhile, host cells also adopt a number of strategies to regulate TLRs-/RLRs-mediated signaling to prevent harmful excessive immune responses. In addition, many viruses also regulate TLRs- and/or RLRs-mediated signaling through their structural or non-structural proteins, thereby escaping the recognition and clearance by the host. In this review, we focus on the mechanisms and regulation of TLRs- and RLRs-mediated signaling, as well as a brief introduction of virus-mediated regulation of TLRs- and RLRs-mediated signaling.

**Key words** TLRs; RLRs; RNA virus; signaling transduction; negative regulation

\*Corresponding author. Tel: 86-27-68753795; E-mail: shuh@whu.edu.cn