

特约综述



天然免疫是机体抵抗微生物入侵的第一道防线, 最终诱导并调节获得性免疫的有效应答。本实验室围绕细胞受到病原微生物感染后天然免疫激活, 并最终产生、分泌细胞因子这一重要生理过程, 通过新基因、新通路的发现与机制研究, 探讨天然免疫反应活化的分子机制, 揭示天然免疫应答失控导致各种与感染免疫相关的疾病, 包括过敏性反应、自身免疫病、慢性炎症(及导致的肿瘤)发生的可能原因。

<http://www.bio.pku.edu.cn/index.php?id=102&action=showmember&uid=56>

病毒感染引发天然免疫细胞信号转导研究进展

孙文香 蒋争凡*

(北京大学生命科学学院, 蛋白质与植物基因研究国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 病毒入侵机体后, 会被天然免疫系统所识别, 进而引发天然免疫信号通路的活化产生一型干扰素(IFN α/β)和一些炎性细胞因子如IL-1 β 。目前研究发现, 病毒入侵信号主要由一类模式识别受体识别, 包括Toll样受体(Toll like receptors, TLRs)、RIG-I样受体(RIG-I like receptors, RLRs)、Nod样受体(Nod like receptors, NLRs)、Hin-200家族蛋白及一些DNA受体, 这些受体介导一型干扰素及炎性细胞因子的产生, 并受到多种严格的调控机制调控。该文将对模式识别受体介导的抗病毒天然免疫信号转导通路及相关调控分子机制做一综述。

关键词 天然免疫; 抗病毒; 细胞信号转导; 一型干扰素

Innate Immune Detection and Activation to Viral Infection

Sun Wenxiang, Jiang Zhengfan*

(State Key Laboratory of Protein and Plant Gene Research, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Viral infections are detected by the innate immune system, which sequentially activates downstream signaling pathways, resulting to the production of type-I interferons (e.g IFN α/β) and many other inflammatory cytokines (e.g TNF α , IL-1 and IL-18). Viral detecting is mediated by a set of receptors called germline-encoded pattern-recognition receptors (PRRs), including Toll-like receptors, RIG-I like receptors, Nod-like receptors, Hin-200 family proteins and some cytoplasmic DNA receptors. Activation of these PRRs will lead to the activation of different signaling pathways, which are all strictly regulated through various protein modifications. In this review, we focus on the current understanding of the antiviral innate immune activation and the related regulating mechanism.

Key words innate immunity; viral infection; cell signaling; type-I interferons

国家自然科学基金(批准号: 31230023、31025010)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62757923, E-mail: jiangzf@pku.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31230023, 31025010)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62757923, E-mail: jiangzf@pku.edu.cn

1989年, Charles Janeway提出天然免疫模式识别理论: 高等生物通过一类模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)特异识别病原微生物在进化上高度保守的分子模式, 称为病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 包括后来我们所知道的核酸、脂蛋白、鞭毛蛋白、脂多糖、肽多糖等^[1]。病毒从基因组的组成可以分成DNA病毒和RNA病毒, 越来越多的研究发现, 这两类不同的病毒侵入机体诱导天然免疫反应分别依赖不同的模式识别受体。病毒跨越宿主体表物理屏障进入细胞后, 在酸性内涵体上, 释放核酸物质被TLRs识别, 并激发一型干扰素及炎性因子产生。病毒的蛋白成分也可以在细胞表面被TLRs识别。侵染在细胞质中的病毒核酸则被细胞内多种模式识别受体识别。RLRs(RIG-I like receptors)是一类识别病毒基因组RNA或RNA中间物质, 并强烈诱导一型干扰素产生的受体。NLRs(Nod like receptors)也是在细胞质中, 参与DNA或RNA病毒识别的模式识别受体。尤其是NLRP3诱导活化蛋白酶caspase-1, 形成炎症小体, 最终活化IL-1和IL-18的成熟剪切, 并诱导一种叫做“pyroptosis”的细胞程序性死亡, 抑制病毒复制^[2]。Hin-200家族成员Aim2和IFI-16和一些DNA受体也是最近报道在抗病毒信号通路中的核酸受体^[3-4]。本文主要介绍天然免疫信号通路在抗病毒过程中的分子机制。

1 TLRs介导的抗病毒天然免疫信号转导

自1996年Hoffmann小组第一次报道Toll分子在果蝇免疫系统中扮演重要角色, 两年后Beutler小组报道小鼠中Toll分子同源蛋白TLR4是革兰氏阴性菌LPS的受体以来, 人们已经在哺乳动物细胞中, 发现了12种有功能的TLRs(Toll like receptors), 越来越多的证据表明, TLRs在抵抗微生物(细菌、真菌、病毒等)入侵过程中发挥至关重要的作用^[5]。Hoffmann和Beutler也因为他们参与天然免疫系统方面的开创性工作, 与另一发现树突细胞在获得性免疫过程中发挥重要作用的科学家Steinman分享2011年诺贝尔医学奖。Toll样受体在抗病毒过程中扮演重要角色是本文关注的一个重点。

1.1 识别病毒核酸成分的TLRs及其转运机制

病毒核酸成分作为一类PAMP能够被多种TLR所识别, 包括TLR3、TLR7/TLR8和TLR9。此类TLRs都定位于细胞内膜结构上, 包括内质网

(Endoplasmic reticulum, ER)、内涵体(Endosome)、溶酶体(Lysosome)、内溶酶体(Endolysosome)^[6]。侵入细胞的病毒在内涵体酸性环境中释放核酸物质, 从而被TLR3、TLR7/TLR8和TLR9所识别。TLRs的细胞内定位避免了对胞外自身核酸物质做出免疫反应, 也很可能是机体区分自我与非我免受自身性免疫伤害的一种有利机制。

TLR3最早发现能够识别人工合成的双链RNA类似物(polyinosinic-polycytidylic acid, poly(I:C)), 也能识别双链RNA病毒的基因组RNA或者单链RNA和一些DNA病毒的双链RNA中间产物。有研究发现, 来自于EB病毒(EBV)感染产生的RNAs(EBERs)通过TLR3依赖的信号转导诱导产生IFN γ 和TNF^[7]。EBERs属于非编码RNAs通过分子内部配对形成茎环结构, 增加了形成双链RNA的可能性。对于TLR7和TLR8, 一种与核糖核酸有着相似结构的咪唑莫特(imidazoquinolines)是它们最早鉴定出来的配体。TLR7和TLR8也是单链RNA的受体, 但是对于识别的特定结构还没有研究清楚, 尽管有报道富含G-U甚至是polyU RNA能够激活TLR7^[8-9]。单链RNA非常不稳定, 宿主本身产生的单链RNA还没来得及被TLR识别就已经被RNA酶降解掉, 只有病毒单链RNA在衣壳蛋白的保护下, 进入内涵体中被裂解释放进而被TLR7/8识别。细菌核酸非甲基化的CpG则是最早被鉴定通过TLR9受体识别的配体, 随后发现很多DNA病毒可以激活这一TLR。尽管体外实验中证明了TLR9识别多种DNA病毒, 但是TLR9缺陷小鼠并没有表现出MyD88缺陷那么严重的表型, 说明存在其他TLR受体冗余的情况, 如TLR2可以识别病毒包被蛋白, TLR3和TLR7识别病毒复制过程中产生的RNA产物。

亚细胞定位对TLR3、TLR7/TLR8和TLR9活化十分重要, 只有内部呈酸性环境的内涵体上面的TLRs可以被病毒核酸物质刺激活化^[1,10]。显然, TLRs从ER上被合成后转运到内涵体上。通过对TLR9糖基化修饰分析, 内涵体上的TLR9在ER合成后穿越了高尔基体, 表明细胞内的TLRs当受到病毒等免疫刺激时是通过经典分泌系统转运到内涵体或内溶酶体的, TLR3和TLR7也有相似的定位及转运途径^[10-11]。TLRs的高效转运有赖于几种伴侣分子的协助, Gp96是热休克蛋白家族成员, 缺失gp96的巨噬细胞在TLR7及TLR9配体的刺激下无反应^[12]。

PRAT4A能够帮助TLR7和TLR9从内质网上转运至内涵体,但对于TLR3的转运是非必需的^[6]。2006年Tabeta等^[14]利用正向遗传筛选方法,筛选到一个3d突变,丧失由TLR3、TLR7和TLR9核酸配体刺激引起的免疫信号通路的活化,后来鉴定这一表型是由于*Unc93b1*基因突变引起。此基因表达12次跨膜内质网蛋白UNC93B1,通过跨膜区与TLR3、TLR7和TLR9相互作用,帮助TLRs离开内质网。过量表达UNC93B1增强了TLR7和TLR9内质网到内涵体的转运^[13-14]。之后有研究表明,TLR7和TLR9竞争性与UNC93B1结合,在自然条件下,UNC93B1与TLR9结合相对于TLR7更紧密,导致TLR9比TLR7信号通路活化强很多。过量表达TLR9的确抑制了TLR7信号通路。这种结合偏好性是由UNC93B1的N末端所介导,*Unc93b1*的N末端缺失突变与TLR7结合更紧密。而对于TLR3来说,UNC93B1的野生型和缺失掉N末端截短体都表现出相似的转运效率。所以,当TLRs受到相应刺激物刺激时,UNC93B1参与TLRs从内质网到内涵体的转运并且在一定程度上影响转运效率^[6]。TLR7和TLR9被运到内涵体后,处于内涵体内部的肽段被多种蛋白酶剪切。TLR9发生剪切后才能招募MyD88,起始免疫信号转导^[15]。另外,在浆细胞样树突细胞中,接头蛋白-3(AP-3)将这些TLRs转运到溶酶体相关膜泡上,致使TLRs招募干扰素调节因子IFN γ 并介导一型干扰素的产生^[16]。然而人们却没有检测到TLR3被蛋白酶剪切修饰。推断剪切后的TLR7和TLR9和全长的TLR3结构相似。

1.2 识别病毒非核酸成分的TLRs

定位在细胞膜上的TLR2和TLR4能够识别一些病毒的包被蛋白。TLR4识别呼吸道合胞病毒(RSV)的病毒组分融合蛋白,经RSV感染的*Tlr4*^{-/-}小鼠中,单核细胞浸润现象减弱,炎症因子IL-12产生量也减少从而导致对病毒的清除能力降低。小鼠乳腺肿瘤病毒MMTV包被蛋白能够激活TLR4,MMTV通过与TLR4的结合加强了侵入受体CD71的表达,从而促进病毒入侵,颠覆了以往人们对TLR4抗病毒功能的认识。TLR4缺陷小鼠避免了由于H5N1禽流感病毒引起的急性肺损伤,TLR4感应氧化胁迫诱导炎症反应^[17]。TLR2也能够被一些病毒的组分蛋白激活,如measles病毒的hemagglutinin蛋白,人的CMV病毒和HSV-1都能够诱导炎症细胞因子的产生^[18]。另外,TLR2也能介导细胞类型依赖的一型干扰素的产生,

炎症单核细胞接受非活化牛痘病毒刺激通过TLR2诱导一型干扰素表达,而巨噬细胞或其他类型树突细胞中TLR2只诱导炎症细胞因子的产生^[19]。TLR2引起的一型干扰素的产生不依赖于病毒核酸物质。TLR2和TLR4在内质网上合成后被转运到细胞膜上,此过程需要伴侣分子Gp96,也需要PRAT4A将TLR2和TLR4从内质网转运离开^[6]。

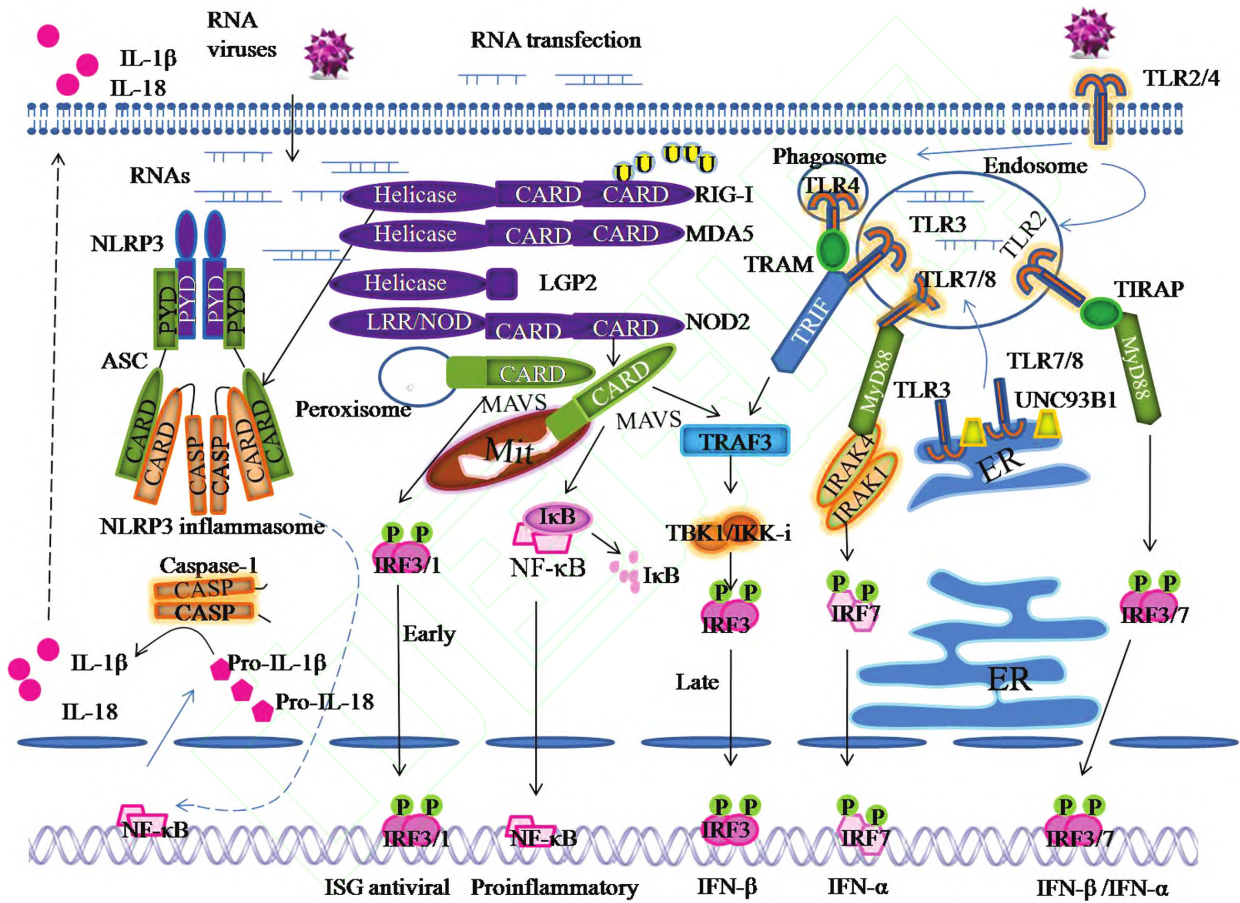
1.3 TLRs介导抗病毒细胞信号转导

TLRs参与抗病毒信号通路的功能很大程度上是因为TLRs识别病毒成分后诱导产生一型干扰素。TLRs将病毒刺激信号传递下去有赖于它的蛋白构造,TLR包含三个结构域:富含亮氨酸重复结构域负责识别PAMPs,跨膜结构域和细胞质中负责将活化信号传导下去的Toll-IL-1(TIR)受体结构域^[1]。活化的TLRs通过TIR结构域招募特定的含有TIR结构域的接头蛋白,如TRIF和MyD88^[20]。TLR3和TLR4都能利用TRIF激活TBK1激酶,从而导致IRF3磷酸化活化。TRIF也是TLR3唯一依赖的TIR接头蛋白。TLR4与TRIF相互作用需要另一TIR接头蛋白TRAM,TRAM的剪接变体TAG,在晚期内涵体上使TRIF与TLR4-TRAM解离,关闭TRIF信号通路,小RNA干扰沉默TAG表达显著增强IRF3的活化^[21]。TLR4也可以利用另一TIR接头蛋白MyD88介导NF- κ B通路活化,TLR4与MyD88相互作用也需要TIR接头分子TIRAP的辅助。肿瘤坏死因子受体相关因子3(TRAF3)在TLR4介导的信号通路中发挥双重功能。首先,在TLR4-NF- κ B通路中,被泛素连接酶cIAP2进行K-48泛素化修饰,之后被蛋白酶体途径降解,致使MyD88复合体转移至细胞质中通过TRAF6与TAK-1相互作用,诱导NF- κ B通路活化(IFNs和IL-1的产生所必须)。cIAP2又是被TRAF6介导的K63位连接的泛素化活化的;TRAF3在TLR4-IRF3通路中却发挥不同的作用,TRAF3被TRIF招募后,发生K63位连接的泛素化并被活化,进而激活TBK1,另外在TLR3-IRF3信号通路中也需要TRAF3被K63位连接泛素化活化^[22]。另外一项研究也揭示,泛素化修饰作用参与TLR3和TLR4通路的调控作用:泛素连接酶Nrdp1介导MyD88发生K48位连接的泛素化修饰导致MyD88被降解,另外介导TBK1 K63位连接的泛素化活化修饰,从而促进一型干扰素产生,使小鼠免受VSV感染危害^[23]。对于TLR7/8,TLR9接受病毒刺激产生一型干扰素有赖于细胞类型,在浆细胞

样树突细胞中, TLR7和TLR9招募接头蛋白MyD88, 最终活化IRF7, 产生一型干扰素(主要是IFN α)。与TLR7和TLR9相似, TLR2诱导产生一型干扰素抗病毒通路发生在Ly6C^{hi}炎性单核细胞中, 需要接头分子MyD88而不需要TRIF^[19](图1和图2)。

病毒入侵细胞后, 病毒的结构蛋白成分可以被细胞膜上的TLR2和TLR4识别, 侵入细胞后在内

涵体酸性环境中释放出的核酸物质被内涵体上的TLR3、TLR7/8和TLR9识别激活免疫信号通路。病毒内化, 细胞质中的病毒核酸等组分则需要TLR受体非依赖性胞质受体识别, 包括RIG-I样受体, NOD样受体和一些DNA受体, 并诱导激活抗病毒信号通路, TLR依赖途径和TLR非依赖相互补充相互合作, 构成机体强大的抗病毒天然免疫信号网络。

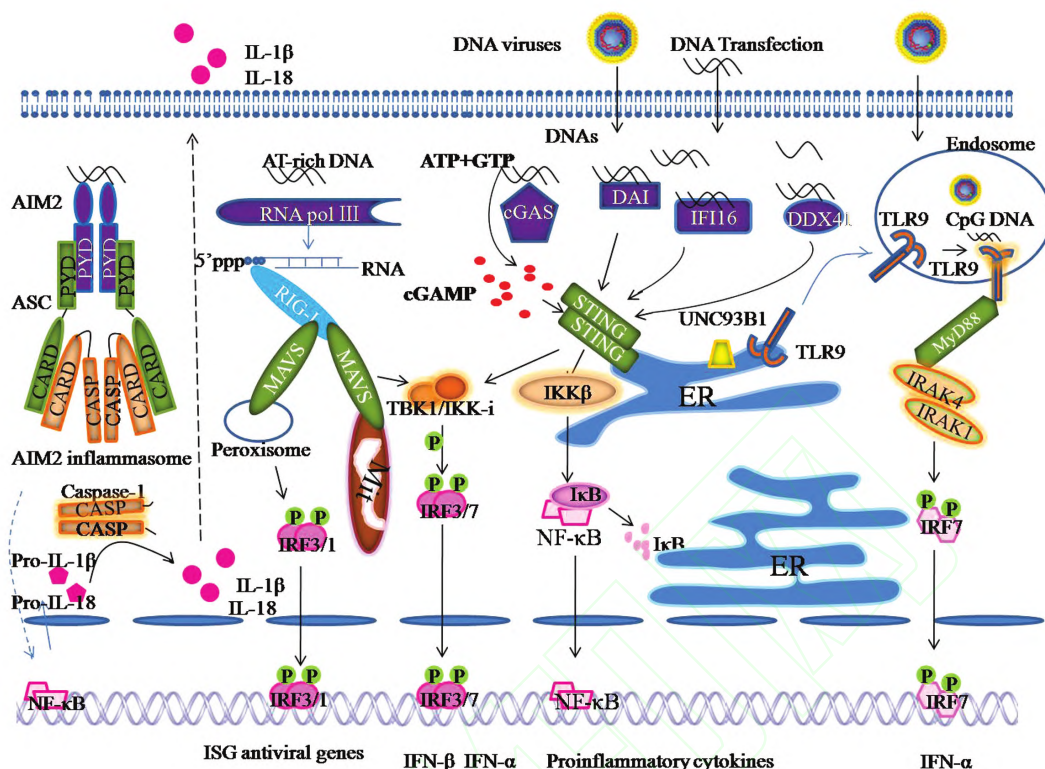


RNA病毒入侵机体细胞后, 刺激TLRs转运到内涵体(TLR3、TLR7和TLR2)或吞噬体(TLR4), 转运需要内质网上一些重要分子的协助(如UNC93B1), 病毒在这些膜泡中被识别激活TRIF或MyD88信号通路激活一型干扰素的产生。胞质中病毒核酸成分则被RLRs(RIG-I、MDA-5和LGP2)和NLRs(NLRP3和NOD2)识别, 前者以及NOD2通过接头蛋白MAVS激活TRAF3-TBK1/IKK-i激活一型干扰素产生, 也可以激活NF- κ B信号通路诱导促炎因子的产生。定位在过氧化物酶体上的MAVS则在更早期诱导一类干扰素诱导基因上调而不诱导干扰素上调。另外, RIG-I同NLRP3类似可以和ASC、procaspase-1形成炎症小体不依赖MAVS的参与, 介导procaspase-1自我剪切活化, 并最终切割pro-IL-1 β 和pro-IL-18成为活化的IL- β 和IL-18, 引发炎症反应并诱导“pyroptosis”性细胞死亡。

Invading of RNA viruses into the host cells stimulates the TLRs trafficking to endosome or phagosome, where TLRs detect the components from viruses. Some ER proteins play a critical role in the TLRs trafficking (e.g UNC93B1). Thereafter, the TLRs recruit the adaptors TRIF or MyD88, and then induce the production of type I interferons. In the cytoplasm, viral RNA is recognized by RLRs (RIG-I, MDA-5 and LGP2) and NLRs (NLRP3 and NOD2). The RLRs and NOD2 need MAVS to activate TRAF3-TBK1/IKK-i complex for the production of type I interferons. MAVS also is a NF- κ B activator that is a precondition of production of proinflammatory cytokines. However, the MAVS on peroxisome activates IFN stimulate genes (ISGs) rather than type I IFNs in a earlier manner. In another hand, RIG-I, similar to NLRP3, together with ASC and procaspase-1 form a complex called inflammasome in a MAVS-independent manner, which will mediate the autocleavage of procaspase-1 to form active caspase-1. Caspase-1 sequentially processes pro-IL-1 β and pro-IL-18 to the mature IL-1 β and IL-18. IL-1 β and IL-18 promotes the inflammatory response and the “pyroptosis” cell death.

图1 RNA病毒介导的天然免疫信号通路活化

Fig.1 Activation of innate immune signaling induced by RNA viruses



DNA病毒入侵宿主细胞, 刺激内质网上合成的TLR9转位至内涵体, 并被一系列内涵体蛋白酶剪切活化, 活化的TLR9能够识别DNA病毒释放的CpG DNA, 并招募接头分子MyD88, 活化IRAK4/1-IRF7信号通路诱导IFN-α的表达上调。细胞质内DNA受体DAI、IFI16、DDX41能够识别结合DNA并通过接头蛋白STING, 通过TBK1/IKK-i诱导一型干扰素的产生或者通过另一激酶IKKβ激活NF-κB信号通路。另一DNA受体RNA聚合酶III则识别AT-rich DNA, 并合成5'三磷酸化双链RNA, 进而被RIG-I识别, 激活MAVS信号通路。最新研究发现, DNA病毒入侵后, 促进cyclic-GMP-AMP合成酶cGAS利用ATP和GTP合成第二信使cGAMP, cGAMP被接头蛋白STING识别, 进而激活下游信号通路。Hin-200家族成员AIM2则识别DNA后与ASC和procaspase-1形成炎症小体, 进而促进IL-1β和IL-18的成熟分泌。

After the DNA viruses invades into the host cells, TLR9 transfers from ER to endosome, where it is cleaved by proteases to the active form. The active TLR9 detects CpG DNA and triggers downstream MyD88-IRAK4/1-IRF7 signaling and finally induce the production of IFN-α. The DNA receptors in the cytosol, such as DAI, IFI16 and DDX41 can also detect DNA and activate TBK1/IKK-i-type I interferon pathway and IKKβ-NF-κB signaling pathway in a STING-dependent manner. RNA polymerase III (pol III) recognizes AT-rich DNA and synthesizes 5'ppp dsRNA, which is a ligand of RIG-I, through the adaptor MAVS leading type I interferon production. A newly DNA sensor cyclic-GMP-AMP (cGAMP) synthase cGAS uses ATP and GTP to synthesize a second messenger cGAMP after DNA viruses invade into cells. cGAMP then binds to STING and triggers the downstream signaling. The Hin-200 family member AIM2 forms inflammasome with ASC and procaspase-1, which then mediates IL-1β and IL-18 maturation.

图2 DNA病毒介导的天然免疫信号通路活化

Fig.2 Activation of innate immune signaling induced by DNA viruses

2 RLRs介导的抗病毒信号通路

2.1 RLRs识别病毒RNA

RLRs属于DExD/H框RNA解旋酶家族, 包括三个成员: RIG-I(视黄酸诱导基因蛋白1)、MDA5(黑色素瘤分化相关基因5)和LGP2(遗传学和生理实验室蛋白2)^[24]。除了LGP2之外, RIG-I和MDA5都含有2个CARD(caspase活化和招募结构域)结构域, 三个成员都含有DExD/H框RNA解旋酶结构域和C末端结构域。RIG-I的C末端结构域中含有抑制结构域(RD结构域), 使RIG-I在细胞静息状态下处于非活化状态^[25]。RIG-I样受体在大多数组织中多种细胞类型中广泛表达, 很多实验室报道RIG-I样受体在细胞内

抗病毒信号通路中扮演重要角色。Loo等^[24]总结了RIG-I和MDA5分别识别不同病毒, RIG-I主要识别丙型肝炎病毒属, 副黏病毒科、正黏病毒科和棒状病毒科等正链或负链RNA病毒, 如丙肝病毒HCV、仙台病毒SeV、新城疫病毒NDV、呼吸道合胞病毒RSV以及流感病毒; 而MDA5主要识别小RNA病毒科病毒如EMCV。也有些病毒被两个受体识别, 如新尼罗河病毒WNV、登革热病毒DGV。RIG-I或MDA5缺陷小鼠都对RNA病毒感染更敏感。RIG-I最早被发现结合双链RNA, 在人工合成双链RNA poly(I:C)刺激下产生一型干扰素。随后的研究表明, RIG-I更倾向于识别含有5'端三磷酸化尾巴的RNA,

5'端三磷酸化的病毒单链RNA也激活RIG-I信号通路^[26-27]。完全去除5'三磷酸化尾彻底阻遏了RIG-I信号通路的活化。Pichlmair等^[27]在研究流感病毒基因组RNA引发的RIG-I依赖的抗病毒信号通路时,也发现5'端至少含有一个磷酸基团修饰才能引发RIG-I激活,完全激活则需要三磷酸化修饰。然而后来有研究发现,人工合成的5'三磷酸化单链RNA不能激活RIG-I信号通路,这种人工合成的RNA不含有任何互补序列或多聚核苷酸基序,单独的5'三磷酸化不能完全决定RIG-I对异源RNA的识别。化学合成的含有5'端三磷酸化并至少20碱基双链RNA是RIG-I的最佳配体^[28]。很多实验室也报道RNA的序列组成也影响RIG-I抗病毒信号通路,RIG-I识别含有poly-U/UC基序的HCV基因组RNA,缺失poly-U/UC基序的HCV基因组RNA完全丧失激活RIG-I依赖一型干扰素的产生^[29]。2009年,两个实验小组报道RIG-I可以识别经RNA聚合酶III(polIII)以dAdT DNA为模板转录成的5'ppp polyAU-RNA^[30-31]。这一发现支持了RIG-I识别5'三磷酸化的PAMP RNA,并且RIG-I很有可能依赖于polIII介导DNA病原微生物引起的免疫反应。所以RIG-I识别5'三磷酸化,并且带有双链结构或多聚核苷酸序列一定序列长度的RNA PAMP^[32]。

经RNA酶L剪切的RNA产物也能刺激诱导RIG-I或MDA5依赖的一型干扰素的产生,RNA酶L通过切割病毒基因组RNA产生RLRs的底物,可能起到扩大抗病毒效应的作用^[33]。RNA酶L消化产生的RNA一般小于200 nt,并且不含有5'三磷酸化修饰,然而这种情况下产生的RNA结构及序列组成研究的还不清楚。而MDA5更倾向于识别长双链RNA,细胞被EMCV或牛痘病毒VACV感染产生具有高度有序结构的RNA,包含单链RNA、双链RNA等结构,能被MDA5识别,作者推断MDA5识别网状分叉RNA结构,而不是线性的RNA。

通过结构分析,RIG-I的CARD和RD结构域介导RIG-I的自我活化调节。在静息状态下,RIG-I处于关闭状态,此时CARD结构域与RD结构域相互作用从而被扣留;当受到免疫刺激时,CARD结构域摆脱RD结构域的抑制,舒展打开招募下游信号分子。晶体结构研究发现RIG-I的802-925氨基酸残基带正电荷结合带负电荷的5'三磷酸化双链RNA,RNA结合后RIG-I蛋白结构改变,CARD结构域打开,进而

招募下游分子激活免疫信号通。与结构研究相一致,RIG-I的RD结构域缺失突变处于持续性激活状态,而CARD结构域的缺失突变则对病毒或RNA引发的免疫活化起到显性负抑制效应。Yoneyama等^[34]报道MDA5则不存在这种自我调节机制,野生型MDA5即能诱导持续性激活。目前,人们都LGP2功能的研究争议颇大,有研究发现Lgp2缺陷小鼠严重减弱了RIG-I和MDA5介导的病毒或poly(I:C)引起的免疫信号活化,表明LGP2作为一个RLR信号通路的辅助因子。然而在外源实验中,LGP2对RLR信号通路起到负调控作用^[5]。目前,人们对于RLRs为何能结合RNA仍然没有研究清楚,RLRs没有典型的RNA结合结构域,也许还需要更多的研究来阐释这一问题。

2.2 RLRs介导的抗病毒信号转导

RLR最早因为诱导一型干扰素通路而被研究人员鉴定出来,当病毒入侵宿主细胞后,分别被RIG-I和MDA5识别,随后都必需通过定位在线粒体上一重要接头蛋白线粒体抗病毒信号分子MAVS(也称作IPS-1、CARDIF和VISA)激活下游通路致使IRF3发生磷酸化并活化^[35-38]。MAVS N末端含有CARD结构域,介导了与RLRs CARD结构域的相互作用,C末端结构域使MAVS定位在线粒体外膜上,线粒体定位对MAVS行使功能至关重要^[37]。后来一项研究中发现部分MAVS也定位在过氧化物酶体上,并在抗病毒信号通路中诱导抗病毒基因的产生,但不诱导一型干扰素的产生,然而定位在线粒体上MAVS主要参与一型干扰素的诱导。这种新型抗病毒通路产生抗病毒蛋白的诱导反应要早于一型干扰素的诱导,MAVS定位不同导致激活抗病毒通路的不同,但是这两种不同的抗病毒分子机制相互关联有待于更深入的研究^[39]。在诱导一型干扰素通路中,MAVS活化后激活下游TRAF3、TBK1和IKK-i,进而磷酸化活化IRF3^[20]。TRAF3、TBK1和IKK-i也是TLR通路激活一型干扰素产生的共用分子。MAVS招募TRAF3,招募到MAVS上的TRAF3发生K63位连接的泛素化,进而招募并激活激酶TBK1和IKK-i对IRF3/IRF7进行磷酸化活化修饰,活化的IRF3/IRF7转移至细胞核,启动一型干扰素的产生(图1)。TRAF3促进一型干扰素通路的活化,TRAF3缺失细胞严重影响了TLRs和TLRs非依赖通路对一型干扰素的激活^[40]。TRIM25是另一调控RLRs通路的重要分子,作为一个泛素连接酶在细胞受到病毒感染刺激时对

RIG-I的CARD结构域进行K172赖氨酸残基K63位连接的泛素化修饰, 这种泛素化修饰作用增强了RIG-I与MAVS的结合, 从而促进了RIG-I抗病毒信号通路的活化^[41]。Zeng等^[42]在体外实验中研究发现, 游离的K63多聚泛素链能够活化RIG-I信号通路, RIG-I的CARD结构域结合泛素链, 揭示也许并不是泛素化修饰诱导了RIG-I信号通路活化, 而是由于RIG-I与泛素链的结合激活通路本身, K63多聚泛素链可能作为信使分子发挥功能。另外, RIG-I也受到去泛素化酶的调控作用, K63特异的去泛素化酶CYLD抑制RIG-I通路对TBK-1和IKK- α 的激活。Zhang等^[43]报道了与此结果相一致, CYLD缺失细胞当受到病毒感染时, 表达更高量的一型干扰素。泛素化修饰效应对调控RIG-I信号通路的稳态, 起着非常重要的作用。我们实验室运用酵母双杂交实验, 寻找MAVS相互作用蛋白, 鉴定了PCBP2参与MAVS通路的调控。PCBP2在病毒诱导下表达上调, 并与MAVS相互作用, 导致MAVS降解, PCBP2作为一接头蛋白, 是通过招募泛素连接酶AIP4对MAVS进行K48位连接的泛素化修饰, 之后MAVS被蛋白酶体途径降解^[44]。

另外, RIG-I也参与病毒引发IL-1 β 的产生, 这是一条和RIG-I-MAVS-IFN β 信号通路完全不同的新的信号转导途径, RIG-I与ASC形成复合体不依赖于MAVS和NLRP3而必需另外两个接头蛋白CARD9和Bcl-10的参与。与RIG-I相反, 另一个RLR MDA5识别病毒后, 引发炎症小体形成则需要NLRP3分子^[45]。

3 NLRs介导的抗病毒信号通路

病毒侵入机体后另一重要特征是产生炎症因子IL-1 β , 引发抗病毒炎症反应并引起发热, 发热能够抑制病毒复制能力起到防御功能。IL-1 β 是前体pro-IL-1 β 经蛋白酶caspase-1剪切后形成的活性形式。caspase-1在一种被称为炎症小体的多蛋白复合体中发现, 炎症小体的形成对IL-1 β 的加工至关重要。炎症小体的组分中还有另一类重要分子: NOD样受体NLR。NLR受体分为NODs、NLRPs和IPAF亚家族。家族成员都含有一个中心负责结合DNA并形成多聚体的NACHT结构域, C末端一般含有亮氨酸富集LRR结构域, N末端则一般为负责蛋白相互作用的CARD结构域或pyrin(PYD)结构域^[2]。目前, 研究最清楚的NLR是NLRP3, NLRP3含有N末端PYD结构域, 中心NACHT结构域和C末端LRR结构域, 并

通过PYD结构域招募同含有PYD和CARD结构域的接头分子ASC, ASC通过其另一端CARD结构域招募procaspase-1形成炎症小体。procaspase-1聚集激活自我剪切活性, 形成成熟caspase-1(p20/p10)并进一步介导pro-IL-1 β 的剪切形成活化形式IL-1 β (图1)。成熟的caspase-1和IL-1 β 会通过非经典的分泌途径分泌到胞外。NLRP3对于流感病毒RNA引起的IL-1 β 加工是必需的, 流感病毒引发的NLRP3炎症小体的活化依赖于溶酶体成熟和活性氧(ROS)信号活化, 抑制ROS产生将阻断流感病毒对IL-1 β 的活化^[46]。

另外有研究, NLRs也参与调控一型干扰素通路, NLR成员NLRX1(即NOD5)定位于线粒体外膜, 通过LRR结构域与MAVS CARD结构域相互作用, 抑制RIG-I-MAVS-IFN β /NF- κ B信号通路, 沉默掉NLRX1显著增强仙台病毒SeV和辛德毕斯病毒SINV对IFN β 的诱导^[47-48]。人THP-1细胞中沉默NLRC5(即NOD27)的表达, 也会抑制SeV和poly(I:C)引起的一型干扰素产生, 但是NLRC5介导抗病毒机制并不清楚^[49]。NOD2是另一被报道参与抗病毒信号通路的NLR, NOD2能够结合病毒单链RNA并且活化IRF3, 诱导一型干扰素的产生^[50], 在HEK293细胞中能够感受劳氏肉瘤病毒的侵染并且介导病毒清除, 内源实验也表明NOD2对于机体抵抗劳氏肉瘤病毒侵染非常重要。NOD2介导的抗病毒信号通路也要通过接头分子MAVS激活一型干扰素产生(图1)。

4 细胞之中DNA受体介导的抗病毒信号通路

4.1 各种DNA受体的发现及抗病毒细胞信号转导

某些DNA病毒入侵宿主细胞后, 释放DNA产物, 在内涵体上富含CpG DNA被TLR9识别, 并诱发免疫反应产生炎症因子或一型干扰素。而细胞质中的DNA物质则由细胞质中的DNA受体感应。最近, 人们在寻找细胞质抗病毒天然免疫DNA受体领域取得了很大进展。

继报道病毒DNA介导ASC依赖而NLRP3非依赖炎症小体活化之后, 4个独立的课题组报道了另一PYHIN家族分子AIM2, 参与双链DNA诱导炎症小体的活化^[51-54]。AIM2包含pyrin和HIN200结构域, HEK293细胞中双链DNA诱导AIM2通过其pyrin结构域招募接头分子ASC, 进而procaspase-1的CARD

结构域与ASC的CARD结构域相互作用构成活化的炎症小体, procaspase-1实现自我剪切形成活化caspase-1, 活化的caspase-1蛋白酶活性被激活, 切割加工生成成熟的IL-1 β 和IL-18(图2)。牛痘病毒VACV诱导炎症小体的组装需要AIM2和ASC分子, 但是不需要NLRP3的参与。值得注意的是, AIM2炎症小体的组装激活了促炎性细胞死亡(pyroptosis), 这种死亡效应也对病毒复制和扩散起到抑制作用。

DAI/ZBP1是最早报道的可能的DNA受体, 小鼠L929成纤维细胞中过表达DAI增强了由胞质DNA诱导的一型干扰素的产生, 小干扰RNA沉默DAI的表达则影响多种胞质双链DNA及DNA病毒HSV-1感染引起的一型干扰素的产生^[55]然而DAI缺陷小鼠对poly(dA:dT), 质粒DNA或DNA病毒引起的免疫反应并没有影响, 在其他种类细胞中, 沉默DAI后并没有对外源DNA引发的免疫反应产生影响^[56-57]。DNA信号通路还需要其他DNA受体参与。上面已经提到RNA聚合酶III (polIII) 能够将poly(dA:dT)转录成5'三磷酸化双链RNA, 进而被RIG-I识别, 经重要接头分子MAVS, 激活TBK1-IRF3/IRF7诱导一型干扰素产生。但是小鼠Mavs^{-/-}胚胎成纤维细胞中, poly(dA:dT)、poly(dI:dC)和calf thymus DNA也会激活一条非依赖与polIII-RIG-I-MAVS信号通路产生一型干扰素。骨髓来源巨噬细胞BMDM中也存在polIII非依赖DNA信号通路^[31]。

HIN-200蛋白家族另一成员分子IFI16(小鼠同源蛋白p204)也被报道作为DNA受体识别双链DNA, 并诱导一型干扰素的产生。THP-1细胞中来源于牛痘病毒非AT-rich 70 bp双链DNA能够诱导polIII非依赖的一型干扰素的产生。通过分析THP-1细胞裂解液中与生物素固定70 bp双链牛痘病毒DNA结合蛋白, IFI16被鉴定出来既能结合70 bp双链DNA也能结合70 bp单链DNA。IFI16招募接头蛋白STING(stimulator of IFN gene, 也称为ERIS或MITA), STING激活TBK1-IRF3-IFN- β 信号通路, 基因沉默IFI16的表达抑制DNA和HSV-1引起的IFN- β 的诱导^[4](图2)。IFI16既能在细胞核内感应HSV-1 DNA也能感应细胞质中转染的DNA或细胞质DNA病毒, IFI16主要定位在细胞核中, 细胞质中也肯定有一定量的IFI16。最近一项研究揭示了IFI16亚细胞定位的机制, 研究发现, IFI16上含有保守的核定位序列NLS。淋巴细胞中, IFI16的NLS序列上发生乙酰化

修饰, 并介导IFI16定位在细胞质中。但是乙酰化修饰抑制IFI16入核的分子机制还不清楚^[58]。值得注意的是, 小RNA干扰IFI16后, DNA诱导一型干扰素的产生只受到部分抑制, 而STING缺失导致的抑制效应要完全的多。暗示还存在其他的DNA受体诱导一型干扰素的产生。

DDX41是另一被鉴定为DNA受体的分子, 属于DExD-H框解旋酶超家族, 在髓样树突细胞中小RNA沉默掉DDX41的表达严重影响了DNA或DNA病毒如HSV-1和腺病毒介导的一型干扰素或其他细胞因子的产生, DDX41既能结合DNA也能结合接头蛋白STING, 并且依赖于STING通过其死亡结构域, 激活TBK1、IRF3和NF- κ B。然而, DDX41只在树突细胞中发挥DNA受体的功能, 所以还不能把DDX41作为普遍适用的DNA受体。最近同一课题组发现, DDX41的负调控蛋白TRIM21, TRIM21是一种泛素连接酶, 通过SPRY-PRY结构域与DDX41相互作用, 介导DDX41发生K48位连接的泛素化, 导致DDX41降解, 从而抑制胞质DNA或DNA病毒引起的天然免疫通^[18,59](图2)。

近期, Chen实验小组^[60-61]连续发表两篇《Science》文章报道环鸟嘌呤腺嘌呤(Cyclic GMP-AMP, 简称为cGAMP)合成酶cGAS能够结合细胞质中转染DNA或入侵病毒DNA, 合成cGAMP, cGAMP是DNA转染或DNA病毒入侵后产生的第二信使, 结合接头蛋白STING, 并激活IRF3产生一型干扰素, 而被鉴定为DNA受体。之前有人已经报道细菌第二信使c-di-GMP和c-di-AMP都能被STING识别激活一型干扰素^[62]。HEK293T-STING细胞中过量表达cGAS能够强烈诱导IFN β RNA上调, 但是在HEK293T细胞中却不能。L929细胞中DNA转染或DNA病毒感染都能诱导cGAMP的合成, 并诱导一型干扰素的产生。L929细胞中RNA干扰沉默STING表达, 阻断了cGAS激活IFN β 的能力, 而相反沉默cGAS的表达并不影响STING诱导IFN β mRNA水平的上调。说明cGAS在STING的上游, 并依赖于STING活化一型干扰素通路。RNA干扰实验也证明, cGAS只在DNA转染或DNA病毒感染引起的一型干扰素活化通路起作用, 而对于依赖于RIG-I的RNA病毒仙台病毒SeV诱导一型干扰素通路不起作用。cGAS是不是一型干扰素信号通路的最终普适DNA受体呢, 也许还需要体内实验进一步验证。但是可以肯定的是细胞

DNA信号通路是由多种受体识别, 分别介导炎症细胞因子或干扰素的产生。

4.2 STING在胞质DNA或DNA病毒引发天然免疫信号通路中起核心作用

STING是一个四次跨膜蛋白, 能够强烈诱导一型干扰素的产生, 并活化NF- κ B信号通路^[63-65]。STING过量表达或受到免疫刺激时, 形成二聚体或多聚体实现自我活化, 进而激活一型干扰素通路, STING的晶体结构研究支持了STING以二聚体形式发挥功能^[63]。STING缺失细胞严重阻断了无序列特征DNA转染或DNA病毒引起的一型干扰素的产生, 但是只是部分抑制RNA病毒介导的一型干扰素的产生^[66]。然而STING并不是DNA受体, 不能结合DNA。对DNA病毒受体的研究发现, 目前被鉴定的多个DNA受体IFI16、DDX41、cGAS和DNA-PK, 都以STING依赖方式参与一型干扰素通路活化。我们实验室的另一项研究, 揭示STAT6天然免疫抗病毒信号通路, 有别于以往经典IL-4/IL-13介导STAT6活化, 早于一型干扰素产生而直接诱导抗病毒原初反应^[67]。RNA或DNA病毒侵入宿主细胞会诱导STAT6发生磷酸化并形成二聚体被活化, 诱导一系列细胞因子产生, 如CCL2、CCL20和CCL26等, 这一新天然免疫通路激活有赖于STING的参与。病毒感染导致STING将STAT6招募到内质网上, STING同时招募激酶TBK1, TBK1对STAT6 S407位丝氨酸残基进行磷酸化修饰, 另外Y641位酪氨酸残基也发生不依赖于经典通路中JAK激酶家族的磷酸化修饰。*Stat6*^{-/-}缺陷小鼠对病毒的敏感性显著增强, 说明STAT6在抗病天然免疫通路中至关重要。

STING介导的天然免疫信号通路受到多种调控模式调控。对STING定位的研究发现STING定位于内质网^[63-64]。当双链DNA转染细胞后, 会导致STING定位变化, STING从ER通过高尔基体转移到细胞质中成点状分布, 并与TBK1在点状结构里共定位。自噬基因*Atg9*基因缺失细胞中, 显著增强了STING与TBK1在点状结构中定位, 从而说明ATG9蛋白负调控STING信号通路^[68]。STING与TBK1结合, 介导TBK1对IRF3的磷酸化修饰, 磷酸化的IRF3形成二聚体转移到细胞核中启动IFN β 和NF- κ B的转录。另外STING也受到泛素化修饰的调控, 泛素连接酶RNF5能够在病毒刺激下与STING结

合, 介导STING K150位赖氨酸氨基酸残基发生K48位连接的泛素化修饰, STING K48位连接的泛素化修饰后被蛋白酶体系统识别并降解, 所以RNF5发挥负调控作用^[69]。相反在另外一篇报道中STING的K150位赖氨酸发生K63位连接的泛素化, 这种泛素化修饰促进STING二聚化, 进而招募TBK1激活一型干扰素通路, 这种K63位连接的泛素化是由泛素连接酶TRIM56介导的, TRIM56作为正调控因子调控STING-TBK1-IFNs通路的活化^[70]。尽管对于STING K150位泛素化研究存在争议, STING的泛素化修饰对于调控STING介导的天然免疫信号通路显然是非常重要的。

5 总结

在过去对模式识别受体将近20年研究历史中, 人们对天然免疫抗病毒通路分子机制的认识取得了较深刻的进步。病毒不同的分子结构, 诱导不同的模式识别受体进而产生不同的抗病毒效应。不同的通路之间又相互联系, 如TRAF3既参与TLRs信号通路调控也参与RLRs信号通路调控; TLRs通路和RLRs共用TBK1/IKK-i复合体激活一型干扰素, 不同通路之间形成复杂的网络降低病毒对机体的危害。机体如何实现区分异己一直是免疫系统正常运行的核心原则, 模式识别受体TLRs亚细胞定位, 以及识别异源物质特殊结构(如TLR9识别CpG DNA)在一定程度上能够帮助解释这一问题。病毒的非核酸物质最近研究发现诱导TLRs抗病毒信号通路, 显然机体对病毒的识别机制要更复杂得多。人们对于细胞质内模式识别受体RLR, NLR以及DNA受体如何区分自我与非我研究的也还不是很清楚。另外, DNA识别通路现在存在很大空白, 细胞内普适的DNA受体还有待进一步确定, 尽管cGAS已经更像是一个普适的DNA受体, 但是还需要更多内源实验来验证, 另外cGAS诱导一型干扰素的产生必然受到多种分子机制调控, 相信未来人们会一步一步揭开天然免疫抗击病毒信号通路的面纱, 为研制抗病毒临床实验药物及策略提供理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011; 34(5): 637-50.
- 2 Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140(6):

- 821-32.
- 3 Hornung V, Latz E. Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(2): 123-30.
 - 4 Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, *et al*. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* 2010; 11(11): 997-1004.
 - 5 Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol* 2011; 29(1): 185-214.
 - 6 Blasius AL, Beutler B. Intracellular Toll-like receptors. *Immunity* 2010; 32(3): 305-15.
 - 7 Iwakiri D, Zhou L, Samanta M, Matsumoto M, Ebihara T, Seya T, *et al*. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med* 2009; 206(10): 2091-99.
 - 8 O'Neill LAJ, Bowie AG. Sensing and signaling in antiviral innate immunity. *Curr Biol* 2010; 20(7): R328-R33.
 - 9 Heil F. Species-specific recognition of single-stranded rna via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303(5663): 1526-9.
 - 10 Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, *et al*. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 2008; 456(7222): 658-62.
 - 11 Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim YM, Ploegh HL. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 2008; 9(12): 1407-14.
 - 12 Yang Y, Liu B, Dai J, Srivastava PK, Zammit DJ, Lefrançois L, *et al*. Heat Shock Protein gp96 is a master chaperone for Toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity* 2007; 26(2): 215-26.
 - 13 Kim Y-M, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing Toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 2008; 452(7184): 234-38.
 - 14 Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, *et al*. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 2006; 7(2): 156-4.
 - 15 Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: Regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(8): 535-42.
 - 16 Sasai M, Linehan MM, Iwasaki A. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* 2010; 329(5998): 1530-4.
 - 17 Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, *et al*. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell* 2008; 13(2): 235-49.
 - 18 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124(4): 783-801.
 - 19 Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol* 2009; 10(11): 1200-7.
 - 20 Chen H, Jiang Z. The essential adaptors of innate immune signaling. *Protein Cell* 2013; 4(1): 27-39.
 - 21 Palssson-McDermott EM, Doyle SL, McGettrick AF, Hardy M, Husebye H, Banahan K, *et al*. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat Immunol* 2009; 10(6): 579-86.
 - 22 Tseng PH, Matsuzawa A, Zhang W, Mino T, Vignali DAA, Karin M. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat Immunol* 2009; 11(1): 70-5.
 - 23 Wang C, Chen T, Zhang J, Yang M, Li N, Xu X, *et al*. The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 'preferentially' promotes TLR-mediated production of type I interferon. *Nat Immunol* 2009; 10(7): 744-52.
 - 24 Loo YM, Gale M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011; 34(5): 680-92.
 - 25 Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, *et al*. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(2): 582-7.
 - 26 Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, *et al*. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; 314(5801): 994-7.
 - 27 Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, *et al*. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded rna bearing 5'-phosphates. *Science* 2006; 314(5801): 997-1001.
 - 28 Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, *et al*. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 2009; 31(1): 25-34.
 - 29 Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale Jr M. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 2008; 454(7203): 523-27.
 - 30 Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 2009; 10(10): 1065-72.
 - 31 Chiu Y-H, MacMillan JB, Chen ZJ. RNA Polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 2009; 138(3): 576-91.
 - 32 Rehwinkel J, Reis e Sousa C. RIGorous detection: Exposing virus through rna sensing. *Science* 2010; 327(5963): 284-6.
 - 33 Malathi K, Dong B, Gale M, Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 2007; 448(7155): 816-9.
 - 34 Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, *et al*. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 2005; 175(5): 2851-8.
 - 35 Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, *et al*. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005; 6(10): 981-88.
 - 36 Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartschlag R, *et al*. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 437(7062): 1167-72.
 - 37 Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF3. *Cell* 2005; 122(5): 669-82.
 - 38 Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu H-B. VISA Is an adapter protein required for virus-triggered IFN- β signaling. *Mol Cell Biol* 2005; 19(6): 727-40.

- 39 Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee ASY, Odendall C, Shum B, *et al.* Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* 2010; 141(4): 668-81.
- 40 Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2005; 439(7073): 208-11.
- 41 Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, *et al.* TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007; 446(7138): 916-20.
- 42 Zeng W, Sun L, Jiang X, Chen X, Hou F, Adhikari A, *et al.* Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* 2010; 141(2): 315-30.
- 43 Zhang M, Wu X, Lee AJ, Jin W, Chang M, Wright A, *et al.* Regulation of IkappaB kinase-related kinases and antiviral responses by tumor suppressor CYLD. *J Biol Chem* 2008; 283(27): 18621-6.
- 44 You F, Sun H, Zhou X, Sun W, Liang S, Zhai Z, *et al.* PCBP2 mediates degradation of the adaptor MAVS via the HECT ubiquitin ligase AIP4. *Nat Immunol* 2009; 10(12): 1300-8.
- 45 Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, *et al.* Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 β production. *Nat Immunol* 2009; 11(1): 63-9.
- 46 Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, *et al.* The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 2009; 30(4): 556-65.
- 47 Lei Y, Wen H, Yu Y, Taxman Debra J, Zhang L, Widman Douglas G, *et al.* The mitochondrial proteins NLRX1 and TUFM form a complex that regulates type I interferon and autophagy. *Immunity* 2012; 36(6): 933-46.
- 48 Moore CB, Bergstralh DT, Duncan JA, Lei Y, Morrison TE, Zimmermann AG, *et al.* NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* 2008; 451(7178): 573-7.
- 49 Neerinx A, Lautz K, Menning M, Kremmer E, Zigrino P, Hosel M, *et al.* A Role for the human nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing family member NLRC5 in antiviral responses. *J Biol Chem* 2010; 285(34): 26223-32.
- 50 Sabbah A, Chang TH, Harnack R, Frohlich V, Tominaga K, Dube PH, *et al.* Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol* 2009; 10(10): 1073-80.
- 51 Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; 458(7237): 514-8.
- 52 Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 2009; 458(7237): 509-13.
- 53 Rathinam VAK, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, *et al.* The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 2010; 11(5): 395-402.
- 54 Bückstümmer T, Baumann C, Blüml S, Dixit E, Dürnberger G, Jahn H, *et al.* An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* 2009; 10(3): 266-72.
- 55 Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 2007; 448(7152): 501-5.
- 56 Ishii KJ, Kawagoe T, Koyama S, Matsui K, Kumar H, Kawai T, *et al.* TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 2008; 451(7179): 725-9.
- 57 Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, *et al.* Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(14): 5477-82.
- 58 Li T, Diner BA, Chen J, Cristea IM. Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(26): 10558-63.
- 59 Zhang Z, Bao M, Lu N, Weng L, Yuan B, Liu Y-J. The E3 ubiquitin ligase TRIM21 negatively regulates the innate immune response to intracellular double-stranded DNA. *Nat Immunol* 2013; 14(2): 172-8.
- 60 Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, *et al.* Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 2013; 339(6121): 826-30.
- 61 Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 2013; 339(6121): 786-91.
- 62 Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, *et al.* STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 2011; 478(7370): 515-8.
- 63 Sun W, Li Y, Chen L, Chen H, You F, Zhou X, *et al.* ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(21): 8653-8.
- 64 Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 2008; 455(7213): 674-8.
- 65 Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, *et al.* The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 2008; 29(4): 538-50.
- 66 Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 2009; 461(7265): 788-92.
- 67 Chen H, Sun H, You F, Sun W, Zhou X, Chen L, *et al.* Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity. *Cell* 2011; 147(2): 436-46.
- 68 Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, *et al.* Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(49): 20842-6.
- 69 Zhong B, Zhang L, Lei C, Li Y, Mao A-P, Yang Y, *et al.* The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity* 2009; 30(3): 397-407.
- 70 Tsuchida T, Zou J, Saitoh T, Kumar H, Abe T, Matsuura Y, *et al.* The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. *Immunity* 2010; 33(5): 765-76.