

干扰素调控因子 3: 细胞抗病毒反应的核心转录因子

刘 星 石贺欣 王 琛*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 固有免疫系统是宿主抵御病毒入侵的第一道防线。I 型干扰素是关键的反病毒细胞因子, 它在细胞建立抗病毒状态的过程中发挥了核心的作用。I 型干扰素的诱导表达是固有免疫的重要调节与效应机制。已有的研究表明: 多种转录因子 (NF- κ B、ATF-2/c-Jun、IRF3、IRF7) 通过在 I 型干扰素的转录调控区形成稳定的转录增强复合物 (enhanceosome), 迅速并大量地诱导 I 型干扰素表达。体内与体外的生物学分析已确立, 干扰素调控因子 3 (IRF3) 是介导细胞表达 I 型干扰素最关键的转录因子, 其转录活力与生物学功能直接影响细胞的抗病毒的能力。近年来, IRF3 相关的细胞信号转导与调控机制等研究取得重大进展。围绕 IRF3 的结构、功能以及分子调控机制等方面, 概述相关的研究进展, 并做前沿展望。

关键词 干扰素调控因子 3, 转录活性调控, 蛋白质翻译后修饰, 细胞信号转导, 抗病毒分子机制

学科分类号 Q291, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00139

病毒是结构简单的非细胞生物体, 它通过感染宿主细胞达到复制与传播。宿主则利用精细的免疫系统控制病毒的扩增, 并最终消灭入侵的病毒。病毒与宿主细胞相互作用时, 病毒自身的关键组分, 即病原体相关的分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP), 会被位于宿主细胞膜或胞质中的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 识别, 进而激活相关的细胞信号转导通路, 启动宿主的抗病毒固有免疫反应。在此过程中, 迅速并强烈地诱导 I 型干扰素 (type I interferon) 的表达是宿主抗病毒的关键应答机制。

人类的 I 型干扰素包括 13 种亚型的干扰素 α 和一种干扰素 β , 它们均具有重要的免疫调节功能。这些细胞因子主要在基因转录的水平, 受到三类转录因子的协同调控: NF- κ B、ATF-2/c-Jun 以及 IRF3/7 (interferon regulatory factor 3/7)^[1]。其中, IRF3/7 在 I 型干扰素的诱导表达中最为关键。IRF3 缺失的小鼠对病毒的耐受性明显差于正常小鼠, 并且 IRF3 缺失的胚胎成纤维细胞在病毒感染条件下诱导产生的 I 型干扰素的量显著降低。在此基础上, 将细胞中的 IRF7 敲除, 当病毒侵染时,

细胞丧失了产生 I 型干扰素的能力^[2]。IRF3 和 IRF7 都属于干扰素调控因子家族, IRF3 在各种组织和细胞中组成性表达, 基本不受病毒侵染或 I 型干扰素诱导表达^[3]; 相反地, IRF7 在正常情况下表达水平很低, 当细胞受到 I 型干扰素处理后, IRF7 能够被迅速并大量地诱导表达。因此, 在病毒入侵的早期, I 型干扰素的表达主要受到 IRF3 的调控。

近年的研究揭示: 当细胞处于静息状态时, IRF3 定位在细胞质中, 处于失活的状态; 当病毒入侵细胞后, IRF3 上游的激酶 TBK1 和 IKK ϵ 磷酸化 IRF3 的 C 端多个丝氨酸和苏氨酸残基。磷酸化后的 IRF3 发生构象变化, 从细胞质迁移到细胞核中, 结合共激活因子 CBP (CREB binding protein), 诱导 I 型干扰素的表达^[4] (图 1)。

* 通讯联系人。

Tel: 021-54921185, E-mail: cwang01@sibs.ac.cn

收稿日期: 2010-03-22, 接受日期: 2010-05-17

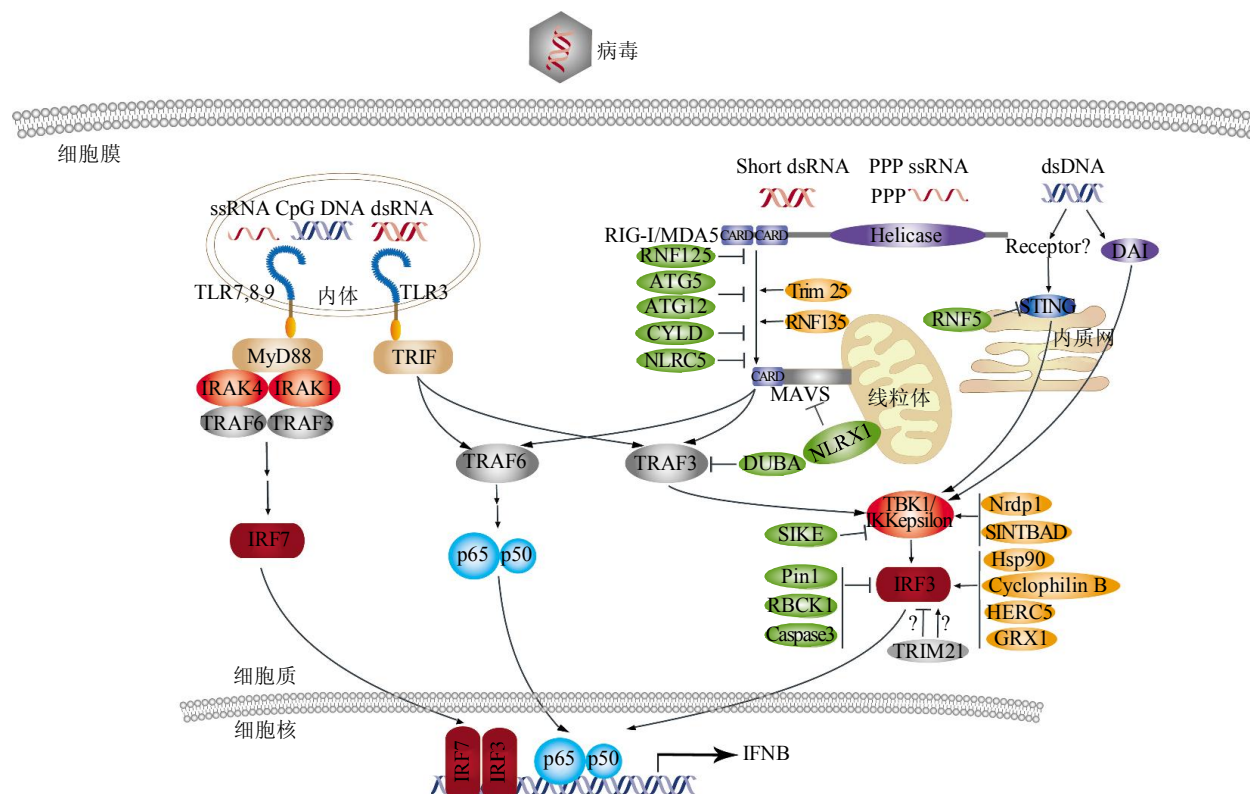


Fig. 1 Activation and regulation of anti-viral signaling pathway

图 1 抗病毒信号通路的激活和调节

病毒感染宿主后, 宿主细胞的模式识别受体(PRR)识别由病毒产生的病原相关的分子模式(PAMP)激活下游信号通路, 建立抗病毒状态. 以内吞的方式进入细胞的病毒, 被定位于内体膜上的 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)识别. 位于内体上的 TLR7/8 和 TLR9 分别识别单链 RNA 和 CpG DNA, 通过招募 MyD88, IRAK4, IRAK1, TRAF6, TRAF3, IKK alpha 等下游一系列接头分子激活 IRF7, 活化的 IRF7 诱导 I 型干扰素的表达. 同样定位于内体上的 TLR3 识别病毒来源的双链 RNA 后, 通过 TRIF 等接头蛋白最后活化 IRF3 和 NF-kappa B. 而在细胞质中复制的病毒, 其 RNA 被定位于胞质中的类 RIG- I 受体(RIG- I-like receptors, RLRs)如 RIG- I 和 MDA5 等识别. RIG- I 和 MDA5 与配体结合后解除自身抑制构象, 暴露 CARD 结构域(Caspase recruitment domains), 并通过 CARD 结构域与定位于线粒体外膜上的接头分子 MAVS(mitochondrial anti-viral signaling protein)(又名 IPS-1, VISA, CARDIF)结合. MAVS 招募 TRAF3 和 TRAF6, 最终激活 IRF3、IRF7 和 NF-kappa B. 活化的转录因子入核发挥转录激活功能, 协同激活 I 型干扰素的表达. 外源 DNA 也能够诱导 I 型干扰素的表达, 定位于内质网上的接头分子 STING 在这个过程中发挥了关键作用. 抗病毒信号通路中, 存在许多正负调控因子. 在图中, 正调控因子用橙色表示, 负调控因子用绿色表示. 例如: 泛素连接酶 TRIM25 催化了 RIG- I 63 位赖氨酸残基连接的泛素化, 能增强 RIG- I 同 MAVS 的相互作用; 而自噬调节因子 Atg5-Atg12 能够打断 RIG- I 和 MAVS 之间的相互作用, 抑制 IRF3 的活化. 关于 TRIM21 对 IRF3 的调节存在争议, 详见正文分析.

1 IRF3 的结构

人类和小鼠的干扰素调控因子家族由 9 个成员组成(IRF1~9), 它们在一级序列和高级结构上表现较高的同源性: 在蛋白质的 N 端具有保守的 DNA 结合结构域(DNA binding domain, DBD), 其中 5 个色氨酸高度保守, DBD 呈现螺旋-转角-螺旋的结构, 与基因启动子中相应的 DNA 序列结合, 除了 IRF1 和 IRF2, 其余成员的 C 端是干扰素

调控因子结合结构域(IRF association domain, IAD), 这一结构域主要介导了家族成员之间的相互作用, 以及家族成员与其他转录因子之间的相互作用.

人源 IRF3 是一个含有 427 个氨基酸的蛋白质, 分子量约 55 ku(图 2a). 解析晶体结构发现, IRF3 结构与转录因子 Smad 家族的 Mad 同源域 2 (Mad homology 2, MH2)相似, 这暗示 IRF3 有可能起源于 Smad, 并且两者在发挥转录调节功能时

有着类似的分子机制^[5-6]。结构生物学的研究提出了 IRF3 活性调控的自抑制模型。静息状况下, IRF3 的 C 端 IAD 结构域与其两端的自抑制元件 (autoinhibitory elements) 形成紧密的疏水核心域, 掩盖了位于 IAD 结构域内介导 IRF3 二聚化以及入核等的关键氨基酸残基, 导致 IRF3 处于自抑制失

活状态; 宿主细胞识别病毒入侵后, IRF3 C 端的若干丝氨酸、苏氨酸被上游激酶磷酸化。通过电荷的排斥作用, IRF3 的构象发生巨大变化, 暴露疏水活性中心以及关键的氨基酸残基, 导致 IRF3 活化并参与相关基因的转录激活。

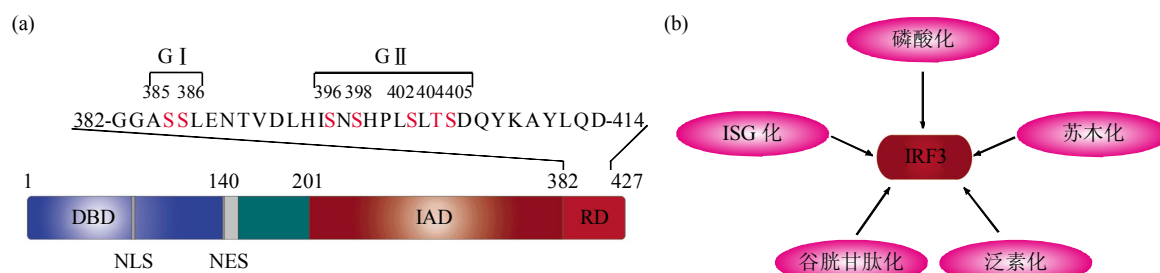


Fig. 2 Schematic representation of IRF3(a) and post-translational modifications of IRF3(b)

图 2 IRF3 的结构示意图(a)和 IRF3 的翻译后修饰(b)

(a)IRF3 的结构示意图显示了该蛋白质的各个结构域, 分别是 DNA 结合结构域(DNA binding domain, DBD), 干扰素调节因子结合结构域 (IRF association domain, IAD), 调节结构域(regulatory domain, RD), 核定位序列(the nuclear localization sequence, NLS)和出核序列(the nuclear export sequence, NES)。调节结构域 382~414 位的氨基酸残基列在示意图上方。红色字体显示的是活化 IRF3 的磷酸化位点。(b) IRF3 的翻译后修饰包括磷酸化、泛素化、苏木化(sumoylation)、谷胱甘肽化和 ISG 化等修饰。

2 IRF3 的蛋白质翻译后修饰调控与相关的生物学功能

蛋白质的翻译后修饰是指在翻译完成后, 将功能性的化学基团共价连接到蛋白质的特定氨基酸残基上, 包括磷酸化、糖基化和乙酰化等。蛋白质的翻译后修饰能够通过改变蛋白质的化学性质或者构象, 对蛋白质的生物学功能进行精准而动态的调节。已发现 IRF3 受到多种翻译后的修饰, 这些修饰大多与病毒感染相关(图 2b)。

2.1 IRF3 的磷酸化修饰

磷酸化修饰 IRF3 是调节其生物学活力的主要分子机制。在正常的细胞中, IRF3 以非磷酸化和本底磷酸化的形式存在, 本底磷酸化的位点位于 IRF3 的 N 端^[4]。由于 IRF3 含有出核序列(nuclear export signal, NES), 在 CRM1(chromosome region maintenance 1)的辅助下, IRF3 主要定位于细胞质中, 但是, 一小部分的 IRF3 穿梭在细胞质和细胞核之间^[7]。病毒的侵染会诱导 IRF3 C 端的氨基酸残基被进一步磷酸化, 这可以通过 ³²P 掺入 IRF3, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳时 IRF3 的迁移率明显改变表征出来。C 端磷酸化的 IRF3 能够从细胞质迁移到细胞核内, 与 CBP 以及对应的启动子序列结

合, 发挥转录激活的功能^[4,8-9]。

进一步的研究表明^[10-12], IkappaB kinase 的两个同源蛋白 IkappaB kinase-epsilon (IKKepsilon) 和 TANK-binding kinase-1 (TBK1) 是 IRF3 上游的激酶, 它们在病毒入侵后, 能够直接磷酸化 IRF3 的 C 端, 导致 IRF3 被活化。对磷酸化诱导 IRF3 激活的机制已有深入的研究。病毒诱导的 IRF3 磷酸化位点主要在 C 端的两组氨基酸残基(G I 和 G II), G I 是位于 385 位和 386 位的丝氨酸残基, G II 是位于 396、398、402、405 位的丝氨酸残基和 404 位的苏氨酸残基。至今, 这两组氨基酸残基的磷酸化在 IRF3 活化过程中的具体功能, 仍然有待明晰。Hiscott 实验室认为, G II 是上游激酶 IKKepsilon 和 TBK1 修饰的位点, G II 的磷酸化对 IRF3 的激活起着决定性的作用。利用 GST-IRF3 (380~427 个氨基酸)多肽为底物, 激酶反应实验发现, 体外翻译或免疫沉淀获得的 IKKepsilon 与 TBK1 主要磷酸化 G II 氨基酸残基^[11-12]。将 G II 的 5 个位点突变成天门冬氨酸, 模拟已磷酸化的 IRF3 (IRF3 5D), 该蛋白质具有很强的组成型转录激活能力。在这 5 个氨基酸残基中, 396 位的丝氨酸残基最为关键, 在病毒感染的条件下, 将 396、398 位突变为丙氨酸的 IRF3 不能够转运至细胞核中,

也不能结合 CBP, 丧失了转录激活的功能^[4]; 如果只将 396 位的丝氨酸突变为天门冬氨酸, 该突变的 IRF3 也能够诱导 I 型干扰素的表达, 与 IRF3 5D 表现同样的效果; 用特异性的磷酸化抗体也可以检测到 IRF3 396 位的丝氨酸被磷酸化^[13]. Fujita 实验室持不同的观点, 他们认为, IRF3 386 位的丝氨酸是上游激酶 IKKepsilon 和 TBK1 磷酸化的位点, 该磷酸化对 IRF3 的激活起着关键的作用. 386 位的丝氨酸突变为丙氨酸的 IRF3 不能够二聚化, 且不能结合 CBP, 失去了转录激活的功能. 在病毒感染的条件下, 用特异性磷酸化的抗体检测到 IRF3 386 位的丝氨酸被磷酸化, 同时, 用该特异性磷酸化的抗体也检测到 IRF3 5D 的 386 位丝氨酸被磷酸化^[8, 14]. 最近, Clement 等^[15]重新研究了病毒诱导的 IRF3 磷酸化的关键位点, 以及磷酸化与 IRF3 转录激活、抗病毒效应等的关系. 空斑实验发现, IRF3 385/386 位点(G I)的磷酸化对于 IRF3 发挥转录活性起着至关重要的作用, 396/398/402/404/405 位点(G II)的磷酸化使 IRF3 更充分发挥其功能. 但是, 质谱分析发现, IKKepsilon 和 TBK1 直接磷酸化 IRF3 396/402 位的丝氨酸. 因此, 目前的激活模型是, 病毒感染细胞导致 IKKepsilon 和 TBK1 活化, 它们首先磷酸化 IRF3 G II 部分位点; 磷酸化后的蛋白质构象改变, 上游激酶再磷酸化 IRF3 的 G I 和 G II, 其中 IRF3 G I 的磷酸化起始了 IRF3 转录激活的过程.

C 端的磷酸化在 IRF3 的活化中起决定性的作用, 其 N 端的磷酸化在某种程度上也影响着 IRF3 的功能. 病毒的入侵还会强烈激活 DNA 依赖的蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK), DNA-PK 能够特异地磷酸化 IRF3 135 位苏氨酸残基. 该位点的磷酸化可以维持 IRF3 的细胞核定位, 抑制 IRF3 的降解, 延续 IRF3 的转录时长^[16]. 最近, 我们实验室发现, JNK 可以直接磷酸化 IRF3 N 端 173 位的丝氨酸残基, 协同 IKKepsilon 和 TBK1 磷酸化 IRF3 C 端, 促进 IRF3 二聚化, 增强 IRF3 的转录激活功能^[17].

IRF3 的磷酸化还可以诱发自身的负调控过程. 在病毒感染时, IRF3 339 位丝氨酸的磷酸化与 IRF3 的活化没有关系, 但是, 该位点磷酸化的 IRF3 会招募肽脯氨酰顺 - 反异构酶 (peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase NIMA-interacting 1, Pin1), 该酶能够特异地识别磷酸化后的丝 / 苏脯氨酰基序列. Pin1 可能使 IRF3 发生顺 - 反异构反应, 促使

IRF3 发生泛素化修饰, 进而通过蛋白酶体途径降解^[18]. 综上, 磷酸化修饰对调控 IRF3 的活力至关重要, 而不同位点的磷酸化的具体生物学功能, 以及它们之间的关系有待进一步地探究.

2.2 IRF3 的泛素化修饰

2.2.1 IRF3 的泛素化导致其降解.

泛素依赖的蛋白质降解是细胞降低或终止转录因子的转录激活活力的重要机制. 这种机制广泛地发生在免疫应答的过程中, 也是负性调控 IRF3 转录活力的重要方式. 研究发现, 病毒侵染宿主细胞后, IRF3 内源的蛋白质表达水平逐渐降低, 用蛋白酶体抑制剂 MG132 或者 Lactacystin 可以抑制 IRF3 的消失, 暗示 IRF3 蛋白可能通过蛋白酶体途径降解^[4, 19-20].

在同样条件下, IRF3 的突变体(K396/398/402/404/405A)不发生降解. 在 TBK1 缺失的细胞中没有观察到 IRF3 发生降解^[4, 20]. 这些现象说明, IRF3 的降解依赖其 C 端的磷酸化. 与此推测一致, C 端磷酸化的 IRF3 会招募 Pin1 和 cullin1^[18, 20]. cullin1 是 SCF 家族泛素连接酶(E3 ligase)的组分, 它们可能催化 IRF3 的多聚泛素化, 但是, 目前尚缺乏实验的证据. Pin1 可以促进 IRF3 多聚泛素化以及被蛋白酶体识别、降解, 具体的分子机制不清楚. 因此, 催化 IRF3 泛素化的泛素连接酶以及相关系统仍然需要深入研究.

有报道认为, 病毒自身可以编码特异的蛋白质, 与 IRF3 相互作用, 促进 IRF3 的降解^[21]. 卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)编码的急早期转录因子 RTA 具有泛素连接酶的活力, 能够促进 IRF3 和 IRF7 的降解^[22]. 这提示, IRF3 的降解可能需要病毒蛋白质. 将病毒灭活后, 尽管仍能够诱导宿主细胞产生抗病毒基因, 但是 IRF3 的降解完全受到了抑制^[23].

2.2.2 抑制 IRF3 的泛素化. IRF3 的多聚泛素化链既可能是 48 位赖氨酸残基分枝的形式, 也可能是 63 位赖氨酸残基分枝的形式. 已有的研究表明, 48 位赖氨酸残基分枝的泛素链参与蛋白酶体途径的蛋白质降解, 而由 63 位赖氨酸残基连接的泛素链则参与信号转导、内吞等过程的调节. Zheng 等^[24]发现, 小鼠肝炎病毒编码的去泛素化酶 PLP2 (Papain-like protease domain 2)能够与 IRF3 结合, 促进 IRF3 去泛素化, 阻止 IRF3 入核, 抑制 IRF3 的激活, 使病毒逃脱固有免疫的监控.

2.3 IRF3 的类泛素化修饰: ISG15/SUMO

IRF3 还能够被类泛素蛋白修饰. 类泛素蛋白是一类小分子蛋白质, 它们与泛素在结构上相似, 可以共价连接到其他蛋白质上. 目前已知的类泛素蛋白包括 SUMO (small ubiquitin-like modifier)、ISG15 (interferon-stimulated gene-15) 以及 NEDD8 (neuronal-precursor-cell-expressed developmentally downregulated protein-8) 等. 类泛素蛋白的共价修饰具有独特的功能, 参与调控许多正常的生理过程. 已报道, 在病毒侵染时, IRF3 能够被类泛素蛋白 SUMO 和 ISG15 修饰. IRF3 的 SUMO 化修饰独立于 IRF3 的磷酸化; 有趣的是, 该修饰可以促进 IRF3 的泛素化, 负性调节 IRF3 的转录激活功能^[25]. 病毒感染宿主细胞后, 可以诱导 ISG15 大量表达, 参与 ISG15 修饰的激活酶(E1)、结合酶(E2)、连接酶(E3)也同时诱导产生. 有关 ISG15 修饰的生物学意义目前研究不多. 我们最近发现, 病毒入侵细胞后, 可以引起 ISG15 修饰 IRF3, 这种生化反应通过 HERC5 催化. ISG15 修饰能够抑制 IRF3 的泛素化, 以及相应的通过蛋白酶体途径的降解. 因此, ISG15 修饰是宿主细胞促进抗病毒反应的一种正反馈调节机制^[26].

2.4 IRF3 的谷胱甘肽化修饰

IRF3 在静息状态时, 组成型被谷胱甘肽修饰. 当病毒侵染宿主细胞时, 细胞质中 GRX-1 (glutaredoxin-1) 催化脱谷胱甘肽反应, 去除 IRF3 的该种修饰. 初步研究表明, 降低 GRX-1 的内源表达水平, 可以影响 IRF3 结合 CBP, 抑制 IRF3 的转录功能, 但是 IRF3 的谷胱甘肽化修饰并不影响 IRF3 的磷酸化、二聚化以及核聚集. 因此, 脱掉谷胱甘肽化修饰是 IRF3 发挥转录激活活性的必要条件^[27]. 但是, 谷胱甘肽化修饰 IRF3 的正常生理功能尚不知晓.

3 IRF3 相关细胞信号转导的正与负调控机制

IRF3 和 NF- κ B 是应答病毒感染的关键转录因子. 一方面, 它们参与诱导重要的抗病毒蛋白质; 另一方面, 它们可以诱导免疫和炎症调节因子, 引起炎症反应, 自身免疫反应等, 可能造成机体的损伤. 因此, 它们的生物学活力受到严格的调控.

病毒感染时, 宿主细胞需要迅速激活激酶 (IKK ϵ 和 TBK1), 然后活化 IRF3. 激酶需要

其他因子才能够准确地识别底物 IRF3, 高效催化其磷酸化. 最近, 我们实验室发现, 分子伴侣 Hsp90 (heat-shock protein of 90 ku) 与 TBK1、IRF3 组成型地形成稳定的蛋白质复合体, 促进抗病毒信号从 TBK1 传递到 IRF3, 协同激活 IRF3. 如果使用抑制剂 GA 和 LA 处理细胞, 特异性抑制 Hsp90, 就可以强烈降低 IRF3 的磷酸化, 明显降低 IRF3 调控的靶基因的表达^[28]. Obata 等^[29]报道另一种类似分子伴侣的蛋白 cyclophilin B 也可以促进 IRF3 的活化. 病毒刺激 10 min 后, 可以检测到 cyclophilin B 与 IRF3 的结合, 30 min 后, 这种相互作用消失. 敲低 cyclophilin B 可以减弱 IRF3 的磷酸化, 以及后续的相关过程. 因此, cyclophilin B 辅助 IRF3 的磷酸化. 有趣的是, cyclophilin B 与 Pin1 一样, 都是顺-反异构酶. 但是, cyclophilin B 的该种酶活性是否参与 IRF3 的活化, 现在仍然未知.

研究发现, I 型干扰素和病毒诱导表达的蛋白质能够调节 IRF3 的转录功能, 形成新的正反馈调节机制. 这种调节主要通过抑制 IRF3 的泛素化降解来实现. 目前已报道 TRIM21 (也称 Ro52 或 SSA1) 和 HERC5 等具有该种功能. TRIM21 属于 TRIM 超家族, TRIM 超家族的成员含有 3 个结构域 (tripartite motif), 它们在进化过程中都相当的保守. 该超家族中的许多成员都能够干扰素刺激条件下表达, 并参与了抗病毒的生物学过程^[30]. 例如, 泛素连接酶 TRIM25 催化了 RIG-I 63 位赖氨酸残基分枝的泛素化, 是 RIG-I 起始抗病毒信号通路必需的步骤^[31]. 我们实验室发现, TRIM21 在抗病毒反应中发挥重要的作用. 过量表达或敲低 TRIM21 分别协同促进或抑制 IRF3 介导的 I 型干扰素的表达. 病毒侵染后, TRIM21 表达升高, 打断 Pin1 和 IRF3 的结合, 抑制 Pin1 介导的 IRF3 的泛素化以及随后的降解. 因此, TRIM21 促进 IRF3 的稳定性, 延长 IRF3 的转录分子过程^[32].

在发表 TRIM21 正调控 IRF3 活力这一研究结果的过程中, 我们注意到了 Higgs 等^[33]同样是关于 TRIM21 调控 IRF3 论文的发表. Higgs 等发现了 TRIM21 同 IRF3 之间特异的相互作用 (在我们的数据里, 更进一步地发现病毒刺激能增强这两者间的结合). 但关于 TRIM21 功能的研究, Higgs 等的结果和我们的截然相反. Higgs 等认为, TRIM21 通过催化 IRF3 泛素化, 促进 IRF3 通过蛋白酶体途径降解, 负调控 IRF3 的活力. 该结论的主要依据是

一个过表达实验, 实验结果似乎显示 TRIM21 增强了 IRF3 的泛素化. 实际上, 我们也进行过类似的实验, 发现 TRIM21 增强 IRF3 泛素化的现象是由于实验设计不严谨所造成. 首先, Higgs 等在实验中使用了 Flag 标签的 IRF3, 而 Flag 标签中含有两个赖氨酸残基, 是潜在的泛素化修饰位点, 当我们在类似实验中使用 Flag 标签的 IRF3 作为底物时, 也观察到微弱的泛素化现象, 但当底物替换为 HA 标签的 IRF3 时, 这种现象就消失了. 更重要的是, 我们不同意 Higgs 等对他们文章的图 4a 和图 4b 的解释, 因为在图 4b 第三个泳道没有外转 Flag-IRF3 的情况下, Western blot 的结果仍然显示出非常明显的弥散条带, 可能的一个解释是, 在 Higgs 等的实验条件下, 显示出来的弥散条带是跟 Flag 抗体交叉反应的某个未知蛋白, 而正好该蛋白质能够被 TRIM21 催化发生泛素化. 病毒侵染能够诱导 IRF3 强烈的泛素化, 这一结论已经得到公认. 因此, 研究 TRIM21 调节 IRF3 泛素化的另一个途径就是下调内源 TRIM21, 检测病毒侵染细胞后, 内源 IRF3 的泛素化变化情况. 如果 TRIM21 是 IRF3 主要的泛素连接酶, 那么 TRIM21 下调后, IRF3 的泛素化应该明显减弱甚至消失. 但在 Higgs 等的文章中并没有这方面的研究, 也没有涉及相关信号刺激对 TRIM21 调控 IRF3 泛素化的影响. 在我们的研究中, 过表达或下调 TRIM21 分别抑制或增强病毒诱导的 IRF3 泛素化水平. 而且 TRIM21 泛素连接酶活力缺失的突变体同野生型具有一样的调控活力. 这些结果非常明确地排除了 TRIM21 作为 IRF3 泛素连接酶的可能性. 我们更进一步检测了在病毒感染的条件下 TRIM21 的生理功能, 发现它能够促进 IFN β 的分泌保护哺乳动物细胞免受 RNA 病毒的侵染. 我们的结果清晰地解释了 TRIM21 通过抑制 IRF3 泛素化降解来正调控 IRF3 的过程.

最近, 另外两个研究组将小鼠的 *Trim21* 基因敲除并研究了其表型, 他们也得出了截然不同的结论^[34-35]. 因此, TRIM21 的功能仍需进一步的研究. 我们最近还发现, HERC5 是 IRF3 的另一个正调控因子^[26]. HERC5 蛋白包括 HECT 结构域和 RCC1 重复序列, I 型干扰素诱导其大量表达. HERC5 具有 ISG15 连接酶的活性, 特异催化活性 ISG15 修饰 IRF3, 提高 IRF3 的稳定性.

IRF3 的负调节机制主要是通过降解 IRF3 终止其转录活力. 正如上文提及, 磷酸化的 IRF3 会招募 Pin1, Pin1 使得 IRF3 的构象发生变化. 未知的

泛素连接酶结合 IRF3 并发生泛素化, 泛素化修饰的 IRF3 通过蛋白酶体途径降解. 该过程的具体分子机制还有待研究. Zhang 等^[36]发现, 泛素连接酶 RBCK1(RBCK protein interacting with PKC1)参与了 IRF3 活力的负反馈调节. RBCK1 在病毒的刺激下, 逐渐被诱导表达, 并伴随着 IRF3 的降解. RBCK1 能够与 IRF3 结合, 促进 IRF3 的泛素化降解. 因此, 在细胞中过表达 RBCK1 会抑制 I 型干扰素的表达, 相反, 敲低 RBCK1 的表达, 则会促进 I 型干扰素的产生.

最近, caspase 家族的成员被暗示参与负调控 IRF3. caspase3 可能促进 IRF3 的降解^[37]; 缺失 caspase8 引起 IRF3 的组成性激活^[38]. 有趣的是, MAVS 不仅介导抗病毒信号, 它还激活 caspase, 诱导细胞的程序性死亡, 并且后者不依赖于 IRF3^[39]. Sharif-Askari 等^[40]发现, 促凋亡因子 Bax 能促进 IRF3 的磷酸化和激活. Bax 定位于线粒体, 线粒体在细胞凋亡过程中起了重要作用, 同样, 抗病毒信号通路中的关键接头分子 MAVS 也定位于线粒体外膜. Bax 是否辅助 MAVS 激活 IRF3, 目前尚无实验证据. 值得注意的是, 细胞的抗病毒信号和凋亡信号通路可能共用了许多因子, 一方面产生大量的 I 型干扰素, 使细胞建立抗病毒状态, 另一方面, 让已感染的细胞主动结束生存, 抑制病毒继续复制传播. 在此过程中, 两条信号通路之间应该存在平衡的调节. 这需要在以后的研究中加以关注.

当然, 也有很多的蛋白质作用在 IRF3 上游的关键信号分子如 MAVS(mitochondrial antiviral signaling)、TBK1, 间接地调节 IRF3 的转录活力, 发挥对抗病毒信号通路的正负调节(图 1). 随着 IRF3 调控因子的逐步发现, 阐明这些调控因子之间是如何相互关联的, 以及它们发挥协同或抑制效应的分子机制, 将是具有挑战性的科学问题.

4 病毒编码的蛋白拮抗 IRF3 的抗病毒作用

为了逃脱固有免疫, 病毒在与宿主共进化的过程中产生了拮抗宿主细胞的反制措施. IRF3 作为抗病毒信号通路的关键位点, 成为病毒攻击的重要部位. 病毒主要通过两种方式抑制 IRF3 的活力:

a. 病毒编码的蛋白抑制 IRF3 二聚化、入核等活化过程. 如埃博拉病毒(Ebola virus)的 VP35 蛋白可以直接干扰 IRF3 的磷酸化、二聚化以及入核, 阻止 IRF3 转录活动, 人乳头状瘤病毒 16 型(human papillomavirus 16)的 E6 蛋白(E6 oncoprotein)也可以

结合 IRF3, 抑制 IRF3 的转录活力, 但 E6 蛋白不影响 IRF3 的泛素化和降解^[19, 41]。b. 病毒编码的蛋白促进 IRF3 降解, 迅速终止 IRF3 的活性。轮状病毒(Rotavirus)的非结构蛋白 1(nonstructural protein 1, NSP1)和致细胞病变型(cytopathic biotype, cp)的牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV) Npro 蛋白可以结合 IRF3, 促进 IRF3 通过蛋白酶体途径降解, 抑制 IRF3 的转录活力^[21, 42]。病毒也可以作用共激活因子, 间接抑制 IRF3 的活性。如人疱疹病毒 8 (human herpes virus 8, HHV-8) 的 vIRF-1 蛋白, 通过与共激活因子 CBP/p300 相互作用, 限制它们同 IRF3 的相互作用, 抑制 IRF3 激活^[43]。

5 总结与展望

病毒不能独立于细胞存在, 细胞被病毒感染后也不同于其正常的生理状态, 细胞和病毒对峙的命运取决于它们之间抗衡的结果。宿主细胞的两类模式识别受体, Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)和 RNA 解旋酶, 负责识别入侵病毒的病原相关的模式分子, 并通过不同的信号转导途径激活抗病毒反应。这些激活的信号途径都会汇聚到 IRF3 的活化, 以及 I 型干扰素的表达。因此, IRF3 是细胞抗病毒信号调控网络中的核心, 在调控宿主与病毒的相互作用中发挥重要的功能。近 10 年的研究使我们对 IRF3 的分子生物学有了较为深入而全面的理解: IRF3 的结构与功能, 细胞调控 IRF3 的分子机制, 以及病毒与 IRF3 的相互作用, IRF3 在固有免疫中的关键功能等。尽管如此, 还有许多重要的问题存在争议, 亟待深入探讨。例如: TBK1 作为 IRF3 上游的激酶如何磷酸化 IRF3, 是否存在新的协同分子参与到 TBK1、IRF3 信号传递复合体中, 从静息到活化过程中, IRF3 的结构是怎样变化的, IRF3 的二聚化、入核和降解等过程的分子机制联系, IRF3 的超磷酸化是否影响其活化以及泛素化降解, 催化 IRF3 的泛素连接酶仍然未知, IRF3 与细胞凋亡, 细胞分化的关系等。这一系列问题的揭示, 将有助于我们进一步了解宿主和病毒间的相互作用, 探明抗病毒通路及调控的分子机制, 为治疗病毒引发的各种疾病提供新的治疗靶点。

参 考 文 献

[1] Wathelet M G, Lin C H, Parekh B S, *et al.* Virus infection induces

- the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer *in vivo*. *Mol Cell*, 1998, **1**(4): 507-518
- [2] Sato M, Suemori H, Hata N, *et al.* Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, 2000, **13**(4): 539-548
- [3] Juang Y T, Lowther W, Kellum M, *et al.* Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(17): 9837-9842
- [4] Lin R, Heylbroeck C, Pitha P M, *et al.* Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(5): 2986-2996
- [5] Qin B Y, Liu C, Lam S S, *et al.* Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nat Struct Biol*, 2003, **10**(11): 913-921
- [6] Takahashi K, Suzuki N N, Horiuchi M, *et al.* X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat Struct Biol*, 2003, **10**(11): 922-927
- [7] Kumar K P, McBride K M, Weaver B K, *et al.* Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**(11): 4159-4168
- [8] Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, *et al.* Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J*, 1998, **17**(4): 1087-1095
- [9] Weaver B K, Kumar K P, Reich N C. Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAFI. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(3): 1359-1368
- [10] Fitzgerald K A, McWhirter S M, Faia K L, *et al.* IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, 2003, **4**(5): 491-496
- [11] Sharma S, tenOever B R, Grandvaux N, *et al.* Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*, 2003, **300**(5622): 1148-1151
- [12] McWhirter S M, Fitzgerald K A, 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
- [13] Servant M J, Grandvaux N, tenOever B R, *et al.* Identification of the minimal phosphoacceptor site required for *in vivo* activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem*, 2003, **278**(11): 9441-9447
- [14] Mori M, Yoneyama M, Ito T, *et al.* Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem*, 2004, **279**(11): 9698-9702
- [15] Clement J F, Bibeau-Poirier A, Gravel S P, *et al.* Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *J Virol*, 2008,

- 82(8): 3984–3996
- [16] Karpova A Y, Trost M, Murray J M, *et al.* Interferon regulatory factor-3 is an *in vivo* target of DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(5): 2818–2823
- [17] Zhang B, Li M, Chen L, *et al.* The TAK1-JNK cascade is required for IRF3 function in the innate immune response. *Cell Res*, 2009, **19**(4): 412–428
- [18] 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
- [19] Ronco L V, Karpova A Y, Vidal M, *et al.* Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*, 1998, **12**(13): 2061–2072
- [20] Bibeau-Poirier A, Gravel S P, Clement J F, *et al.* Involvement of the I κ B kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *J Immunol*, 2006, **177**(8): 5059–5067
- [21] Barro M, Patton J T. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(11): 4114–4119
- [22] Yu Y, Wang S E, Hayward G S. The KSHV immediate-early transcription factor RTA encodes ubiquitin E3 ligase activity that targets IRF7 for proteasome-mediated degradation. *Immunity*, 2005, **22**(1): 59–70
- [23] Collins S E, Noyce R S, Mossman K L. Innate cellular response to virus particle entry requires IRF3 but not virus replication. *J Virol*, 2004, **78**(4): 1706–1717
- [24] Zheng D, Chen G, Guo B, *et al.* PLP2, a potent deubiquitinase from murine hepatitis virus, strongly inhibits cellular type I interferon production. *Cell Res*, 2008, **18**(11): 1105–1113
- [25] Kubota T, Matsuoka M, Chang T H, *et al.* Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression. *J Biol Chem*, 2008, **283**(37): 25660–25670
- [26] Shi H X, Yang K, Liu X, *et al.* Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 *via* ISG15 modification. *Mol Cell Biol*, 2010, **30**(10): 2424–2436
- [27] Prinarakis E, Chantzoura E, Thanos D, *et al.* S-glutathionylation of IRF3 regulates IRF3-CBP interaction and activation of the IFN beta pathway. *EMBO J*, 2008, **27**(6): 865–875
- [28] Yang K, Shi H, Qi R, *et al.* Hsp90 regulates activation of interferon regulatory factor 3 and TBK-1 stabilization in Sendai virus-infected cells. *Mol Biol Cell*, 2006, **17**(3): 1461–1471
- [29] Obata Y, Yamamoto K, Miyazaki M, *et al.* Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem*, 2005, **280**(18): 18355–18360
- [30] Ozato K, Shin D M, Chang T H, *et al.* TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2008, **8**(11): 849–860
- [31] Gack M U, Shin Y C, Joo C H, *et al.* TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*, 2007, **446**(7138): 916–U2
- [32] Yang K, Shi H X, Liu X Y, *et al.* TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response. *J Immunol*, 2009, **182**(6): 3782–3792
- [33] 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
- [34] Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, *et al.* Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by dysregulating the IL-23-Th17 pathway. *J Exp Med*, 2009, **206**(8): 1661–1671
- [35] Yoshimi R, Chang T H, Wang H, *et al.* Gene disruption study reveals a nonredundant role for TRIM21/Ro52 in NF- κ B-dependent cytokine expression in fibroblasts. *J Immunol*, 2009, **182**(12): 7527–7538
- [36] Zhang M, Tian Y, Wang R P, *et al.* Negative feedback regulation of cellular antiviral signaling by RBCK1-mediated degradation of IRF3. *Cell Res*, 2008, **18**(11): 1096–1104
- [37] Areste C, Mutocheluh M, Blackbourn D J. Identification of caspase-mediated decay of interferon regulatory factor-3, exploited by a Kaposi sarcoma-associated herpesvirus immunoregulatory protein. *J Biol Chem*, 2009, **284**(35): 23272–23285
- [38] Kovalenko A, Kim J C, Kang T B, *et al.* Caspase-8 deficiency in epidermal keratinocytes triggers an inflammatory skin disease. *J Exp Med*, 2009, **206**(10): 2161–2177
- [39] Lei Y, Moore C B, Liesman R M, *et al.* MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. *PLoS One*, 2009, **4**(5): e5466
- [40] Sharif-Askari E, Nakhaei P, Olieri S, *et al.* Bax-dependent mitochondrial membrane permeabilization enhances IRF3-mediated innate immune response during VSV infection. *Virology*, 2007, **365**(1): 20–33
- [41] Basler C F, Mikulasova A, Martinez-Sobrido L, *et al.* The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor - 3. *J Virol*, 2003, **77**(14): 7945–7956
- [42] Chen Z, Rijnbrand R, Jangra RK, *et al.* Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, 2007, **366**(2): 277–292
- [43] Lin R, Genin P, Mamane Y, *et al.* HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators. *Oncogene*, 2001, **20**(7): 800–811

Interferon Regulatory Factor 3, A Pivotal Transcription Factor for Host Antiviral Responses

LIU Xing, SHI He-Xin, WANG Chen*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract The innate immune system is the first line of host defense against viruses. Type I interferons (IFNs), the vital antiviral cytokines, play a critical role in establishing host antiviral state. Induction of type I IFN requires the formation of a multi-protein enhanceosome, including three families of key transcription factors (NF- κ B, IRF3/7, and ATF-2/c-Jun). Transcription factor IRF3 (interferon regulatory factor 3) plays a pivotal role and is tightly regulated in this process. Recently, much progress has been made on cellular signal transduction and regulation of IRF3. Relevant advances in IRF3 biology were summarized with respect to its structure, function and regulatory mechanisms.

Key words interferon regulatory factor 3, transcription regulation, post-translational modification, signal transduction, antiviral mechanism

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00139

*Corresponding author.

Tel: 86-21-54921185, E-mail: cwang01@sibs.ac.cn

Received: March 22, 2010 Accepted: May 17, 2010