

线粒体抗病毒信号蛋白(MAVS)在宿主天然免疫信号通路中的调节作用*

杨星星^{1, 2)} 王 凯¹⁾ 陈晓娟¹⁾ 邢雅玲¹⁾ 陈忠斌^{1, 2)**}

(¹⁾ 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850; ²⁾ 安徽医科大学研究生院, 合肥 230032)

摘要 线粒体抗病毒信号蛋白(MAVS)作为一种接头蛋白在调节宿主天然免疫信号通路过程中扮演重要角色。Toll 样受体(TLR)和 RIG- I 样受体(RLR)等细胞模式识别受体识别入侵的病原体并将信号传递给 MAVS, MAVS 通过刺激下游的 TBK1 复合体和 IKK 复合体分别活化 NF- κ B 和 IRF3 等信号通路, 进而激活干扰素 α/β 表达, 诱发细胞内抗感染天然免疫反应。MAVS 除定位线粒体外, 也可定位于过氧化物酶体上。MAVS 在细胞内的不同定位决定了其在早期快速和持续性抗病毒天然免疫中的不同调节机制。MAVS 只有同时定位在过氧化物酶体和线粒体上才可诱导干扰素刺激基因(ISG)快速且稳定地表达。本文通过对 MAVS 的发现、结构、细胞定位及其在天然免疫信号通路中的调控机制等最新进展进行综述, 以期揭示 MAVS 蛋白在细胞内天然免疫信号通路中的重要调节作用, 为研究病毒逃逸宿主天然免疫的机制和研究新型抗病毒免疫治疗策略提供新思路。

关键词 MAVS, 天然免疫, I 型干扰素, RIG- I, TLR

学科分类号 R392, Q257

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00513

天然免疫系统是生物在长期进化中逐渐形成的, 具有广泛特异性, 是抵御外来侵袭的第一道防线^[1]。天然免疫系统可以通过一类模式识别受体(pattern-recognition receptor, PRR)识别病原体相关模式分子(pathogen associated molecule pattern, PAMP), 进而启动天然免疫实现细胞吞噬、系列炎症细胞因子及趋化因子的合成和分泌, 上调抗原递呈细胞表面共刺激分子的表达, 诱导 T 或 B 淋巴细胞向效应 T 或 B 细胞分化, 最终强化获得性免疫^[2]。细胞内的 PRR 主要包括 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)、RIG- I 样受体(RIG- I-like receptor, RLR) 和 NOD 样受体(nucleotide oligomerization domain(NOD)-like receptor, NLR)。这些受体可以识别入侵的病原体并分别通过相应的信号通路诱发细胞天然免疫反应, 但是相关信号通路的具体调控机制仍然不是很明确。后续研究发现: 线粒体在宿主细胞抗病毒反应中发挥重要作用, 这种抗病毒反应主要依赖于线粒体外膜上的一种接头蛋白, 即线粒体抗病毒信号蛋白(mitochondria antiviral signaling protein, MAVS)。受到病毒刺激以后, RIG- I 构象

发生改变, N 端 caspase 招募结构域(amino-terminal caspase recruitment domain, CARD)暴露出来, 并与 MAVS CARD 结构域相互作用从而招募 TBK1 (TANK-binding kinase 1) 和 IKK ϵ (IkappaB kinase) 形成复合体, 进而激活 IRF3(interferon regulatory factor 3) 或 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 等天然免疫相关信号通路并诱导干扰素表达, 最终参与抗病毒天然免疫反应。

1 MAVS 的发现、结构与细胞定位

1.1 MAVS 的发现

细胞天然免疫系统的重要性在于识别入侵的病原微生物并建立有效的宿主防御。了解病原体感染宿主后天然免疫系统中起促进作用的关键蛋白质是

* 国家自然科学基金资助项目(81172799, 81273231)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66930297, Fax: 010-88272105

E-mail: chenzb@bmi.ac.cn or chenzhongbin@yahoo.com

收稿日期: 2012-10-21, 接受日期: 2013-02-01

认识天然免疫系统的关键. RIG- I 可以结合细胞内病毒 dsRNA, 同时对于 IFN 介导的抗病毒反应也是必需的. 但是 RIG- I 如何活化 IRF3 和 NF- κ B 通路, 以及另一个 RIG- I 样蛋白 MDA-5 在抗病毒天然免疫中的功能为何与 RIG- I 存在明显差异仍不得而知, 直到一个定位于线粒体的新蛋白 MAVS 的发现. 2005 年, 4 个独立研究小组分别发现了同一个作用于 RIG-I/MDA-5 下游的接头蛋白并给予其不同命名. Seth 等^[2]通过序列相似性研究发现此衔接蛋白可以诱导 NF- κ B 通路和 IRF3 通路, 因此将其命名为 MAVS (mitochondrial antiviral signaling). Kawai 等^[3]从鼠 cDNA 序列中发现一个可以激活 IFN- β 的新分子, 随后将其命名为 β 干扰素启动子刺激因子 1 (interferon- β promoter stimulator 1, IPS- I). Meylan 等^[4]通过与 Seth 相同的方法发现一种可以招募信号激酶 IKK α 、IKK β 和 IKK ϵ 至其自身 C 端并刺激 IRF3 和 NF- κ B 转录的新分子, 即 Cardif (CARD adaptor inducing IFN- β). Matsuda 小组发现 12 种可以激活 NF- κ B 的未知蛋白, Xu 等^[5]在研究这些蛋白质表达时发现其中唯一可以诱导 NF- κ B 通路的蛋白质, 并将其命名为 VISA (virus-induced signaling adaptor). 为简便起见, 本文采用常用名称 MAVS 进行叙述.

1.2 MAVS 的分子结构

MAVS 蛋白通过核基因组编码, 在不同细胞中均有分布, 分子质量约 56 ku, 鼠源和人源 MAVS 基因相似性约为 45%. 生理条件下 MAVS

可以形成超大分子复合体, 约 600 ku. 在人类 cDNA 文库和 EST (expressed sequence tag) 序列中发现, 人源 MAVS 的 mRNA 含有长短不同的两个剪接体, 分子质量分别为 3.4 kb 和 9.5 kb. MAVS 包含 N 端 CARD 结构域, 中间富含脯氨酸结构域 (proline-rich region, PRR) 和 C 端跨膜结构域 (transmembrane, TM)^[6]. MAVS 的 N 端 CARD 结构域具有半胱天冬酶活性及六螺旋结构, 其中 H1a、H3 和 H4 可以形成疏水正极表面, H2 与 H6 可形成亲水负极表面, 此外其还介导同型 CARD 蛋白之间相互作用, 例如: RIG- I 或 MDA-5 可以通过 CARD 与 MAVS 完成同性互作, 但是据报道缺失负极表面的突变体无此作用^[7-8]. MAVS 的 PRR 结构域含有脯氨酸结合位点和 P-x-x-P 基团, 并可以与肿瘤坏死因子受体相关因子 TRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factor) 家族的 TRAF2、TRAF3、TRAF6 结合^[9]. MAVS C 端的 TM 结构域可以准确地将 MAVS 靶向线粒体外膜^[2]. 研究发现, 利用定位于其他膜的多肽序列置换 MAVS 自身的 TM 结构域, 或者直接缺失 TM 结构域, 均会使 MAVS 由线粒体外膜重新定位于细胞质, 这种异常定位导致 MAVS 介导的信号通路被阻断, 由此提示 MAVS 的线粒体定位对其抗病毒免疫功能至关重要. 根据以上对 MAVS 结构的描述, 可绘制出一幅人源 MAVS 蛋白结构示意图 (图 1)^[7].

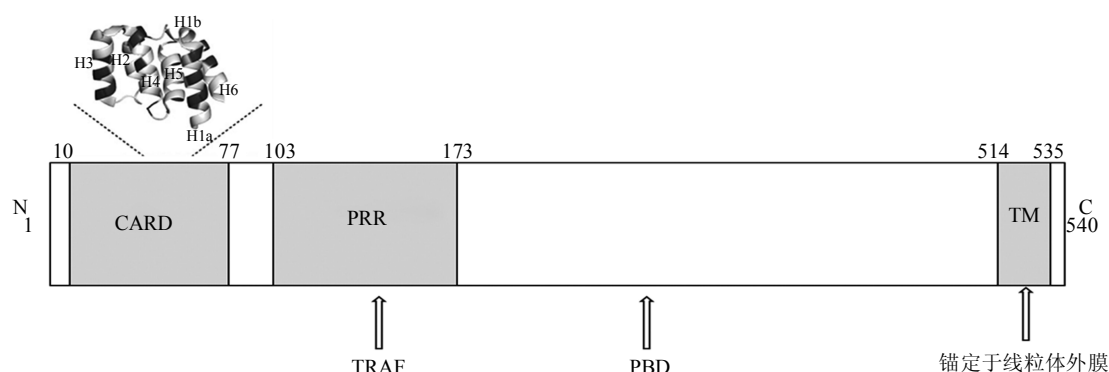


Fig. 1 The structure of MAVS, the mitochondria antiviral signaling protein

图 1 MAVS 结构示意图

1.3 MAVS 的亚细胞定位及功能

最初认为 MAVS 定位于细胞线粒体外膜^[2]. 近来研究发现, 线粒体蛋白 Fis 和 Mff 存在于过氧化物酶体, 并参与调节这两种细胞器形态^[10-11]. 于是

推测 MAVS 可能也存在于过氧化物酶体, Kagan 等^[12]验证了此推测. 据报道 MAVS 可能分布于线粒体相邻区的膜 MAM (mitochondria-associated membranes) 上^[13]. MAVS 的不同亚细胞定位, 提

示其功能与作用机制可能存在多样性和复杂性。

MAVS 在线粒体和过氧化物酶体等细胞器的不同定位决定其在天然免疫调节中的特异性。Seth 等^[2]分别构建 MAVS 突变体: MAVS-Pex(只位于过氧化物酶体)、MAVS-Cyto(位于细胞质)、MAVS-Mito(仅位于线粒体)和 MAVS-Mimic(定位于过氧化物酶体和线粒体)。病毒感染细胞后, 用抗蝰(蛇)毒素蛋白(anti-Viperin)抗体进行检测发现野生型 MAVS、MAVS-Mito 和 MAVS-Mimic 均可以诱导 Viperin 表达且呈 MAVS 依赖性, MAVS-Cyto 却不能诱发 Viperin 表达, 研究表明 MAVS 细胞内膜定位的重要性。尽管 MAVS-Pex 只定位于过氧化物酶体但其可以诱导 Viperin 表达。动力学研究发现, 病毒感染 4 h 后野生型 MAVS、MAVS-Mimic 和 MAVS-Pex 均诱导 Viperin 表达, 而 MAVS-Mito 却相对滞后。由此可见: 过氧化物酶体 MAVS 可以引发干扰素刺激基因(interferon-stimulated genes, ISGs)快速、短暂、不稳定的表达, 而线粒体 MAVS 可以诱导 ISG 迟发、稳定的表达, 因此野生型 MAVS 可以诱发 ISG 快速稳定的表达^[12-13]。以上研究可以看出 MAVS 主要介导细胞内天然免疫, 诱导 I 型干扰素产生。

2 天然免疫通路中 MAVS 信号体的活化及机制

宿主受 RNA 病毒感染后, RNA 解螺旋酶(RIG-I 和 MDA-5)识别病毒衍生 RNA 配体, 进而 RIG-I 和 MDA-5 构象发生改变^[14], 改变后的 RIG-I /MDA-5 转移到线粒体外膜并与线粒体外膜衔接蛋白 MAVS 相互作用。迄今为止, 对于 RIG-I /MDA-5 样受体与 MAVS 结合后如何活化并调控 MAVS 的研究甚少, 原因在于整个活化过程各信号分子之间相互作用十分短暂, 且作用过程很不稳定, 这导致以现有方法很难精确测定各种信号分子在相互作用时的构象变化。一种基于荧光分析方法很好地展现了 MAVS 信号体的结构特点。Baril 等^[15]发现由 TM 结构域介导 MAVS 二聚化在激活 NF- κ B 和 IRF3 信号通路中发挥重要作用。此外, Loo 等^[16]发现, 通过荧光共振能量转移 FRET (fluorescence resonance energy transfer)分析方法证明当 RIG-I 募集到 MAVS 蛋白后, MAVS 便招募下游信号分子, 迄今已发现约有 30 多种分子可与 MAVS 相互作用。

除 TM 结构域外, MAVS CARD 结构域对

MAVS 信号体的活化具有重要作用, 其不仅形成寡聚化, 而且形成朊病毒样聚集物从而激活 IRF3 通路。病毒感染宿主后, RIG-I 可与病毒 RNA 相应配体结合并形成 K63 连接的多聚泛素化, K63 连接的泛素化 RIG-I CARD 结构域便与定位于线粒体的 MAVS CARD 结构域相互结合。随后, MAVS CARD 结构域便形成朊病毒样聚集物, 此聚集物快速将其他 MAVS 分子聚集在一起, 从而形成更大的朊病毒样聚合物, 因此又称其为 MAVS 聚集物。MAVS 聚集物是其功能必需的, 可以与细胞质中的很多信号蛋白(如 TRAF 蛋白)相互作用, 从而活化激酶 IKK ϵ 和 TBK1 以及 IRF3 信号通路^[9]。

2.1 MAVS 是 RIG-I 信号通路的枢纽

MAVS 含有一个类似于 RIG-I 的 CARD 结构域, 两者 CARD 结构域均是病毒诱导产生 IFN- β 必需的。Xu 等^[9]发现 MAVS 可以与 RIG-I /IRF3 相互作用, 但 RIG-I 本身不与 IRF3 相互作用。当 RIG-I、IRF3 和 MAVS 共转录后, MAVS 便招募 IRF3 至 RIG-I 并使两者相互作用, 由此可见 MAVS 是 RIG-I 介导 IRF3 信号通路活化必需的^[9]。RIG-I 信号通路中的许多衔接蛋白可通过结合 MAVS 不同结构域从而与 MAVS 发生相互作用。

2.1.1 与 MAVS PRR 结构域结合的蛋白质。

MAVS 的 PRR 结构域包含许多 TRAFs 结合位点即 TRAF 作用单元 (TRAF-interaction motifs, TIM)^[9]和其他的细胞质信号肽, PRR 结构域可以招募这些蛋白质便形成 MAVS 聚集物。MAVS 含有 2 个保守 TRAF6 结合位点 PxExx 和 1 个 TRAF2 结合位点 PxQx(T/S), MAVS 可以通过这些结合位点与 TRAF6、TRAF2 相互作用进而激活 NF- κ B, 具体机制可能类似于 TLR 通路^[9]。此外, MAVS 可募集 TRAF3 /TRAF6 并激活两类蛋白激酶复合体。一类是 TBK1 或多种与 IKK 相关衔接蛋白, 例如 TANK、nap 1 和 NEMO。STING 可通过与 TRAF3 相互作用将 TBK1 和 IKK ϵ 招募至 NEMO 从而形成 TBK1 复合体; TBK1 复合体能够诱导 IRF3 和 IRF7 转录因子二聚化和磷酸化, 并使其转位到细胞核内结合干扰素刺激反应元件 ISRE (IFN-stimulated response elements), 最终导致 I 型干扰素表达和一系列干扰素诱导基因产生^[17]。另一类复合体则包含 IKK α 、IKK β 和 NEMO。在以上两类复合体中 NEMO 起重要作用, 研究表明: NEMO 缺失后病毒诱导的 IRF3 磷酸化受到抑制^[18]。

蛋白质组学研究发现：在病毒诱导的干扰素通路中 NEMO 与 MAVS 存在必然联系，NEMO 是联系 TBK1 与 MAVS 的桥梁^[18-20]。

MAVS 也可通过与 TRAF6/ TRAF2 相互作用来活化 NF- κ B，TRAF6 缺失的小鼠 NF- κ B 表达水平与野生型相比明显下降。当表达 TRAF6、TAK1、IKK β 突变体时，NF- κ B 不能被活化，从而推测 MAVS 主要通过 TRAF6-TAK1-IKK 途径激活 NF- κ B 通路。TRAF2 可以与 TRADD 复合体中 RIP1 相互作用，从而使 RIP1 具有 E3 泛素连接酶功能并发生 K63 连接泛素化，进而招募下游 IKK α 和 IKK β 至 NEMO，激活 NF- κ B 通路。

TRADD 是含有肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域(tumor necrosis factor receptor-associated death domain)的蛋白质，其与 Fas 相关死亡结构域 FADD (Fas-associated death domain)相关蛋白以及受体结合蛋白 RIP1(receptor interacting protein 1) 在 RIG- I 介导的 NF- κ B 通路中具有重要作用^[21]。免疫共沉淀显示 TRADD 也可以与 MAVS、MAVS 缺失 CARD 及 TM 结构域的突变体相互作用且过表达 RIP1 会增强此相互作用，但其不与只包含 CRAD 结构域的 MAVS 突变体相互作用。TRADD 可以与 FADD 和 TRAF2 相互作用，且过表达 TRADD 可以激活 NF- κ B 通路。缺失 FADD 和 RIP1 后，机体对病毒的易感性增强。Kawai 等^[9]发现，FADD 和 RIP1 可以与 MAVS 相互作用，因此过表达 FADD 和 RIP1 也可以激活 NF- κ B 通路，这一现象验证先前人们对 MAVS、TRADD 和 RIP1 形成复合体的推测。近年有研究报道 FADD 只有在 RIP1 和 TRADD 存在情况下才能被 MAVS 招募，因为 FADD 与 MAVS 之间没有直接相互作用^[22]。由此可见 TRADD、FADD 和 RIP1 是以复合体形式与 MAVS 相互作用并在 RIG- I 介导的信号通路中发挥作用。外膜蛋白转移酶 TOM70 (translocase of outer membrane 70) 也被证实是 MAVS 信号体重要组成部分，参与介导 TBK1/IRF3 进入线粒体^[23]。

2.1.2 与 MAVS TM 结构域结合的蛋白质。

近年研究发现，干扰素基因刺激因子 STING^[22] (stimulator of interferon genes)、也称为 MITA^[24] (mediator of IRF-3 activation)、ERIS^[25] (endoplasmic reticulum interferon stimulator)或 MPYS^[26] (基于蛋白质 N 端的氨基酸残基缩写命名)，是 MAVS 下游衔接蛋白之一，能够与 MAVS 相互作用并激活下游

NF- κ B 和 IRF3 信号通路，MAVS-STING 相互作用的发现在线粒体介导的抗病毒天然免疫反应中具有非常重要的作用^[22, 24]。Zhong 等^[24]发现，静息状态下 STING 与 MAVS 持续相互作用，STING N 端与 MAVS C 端相互结合，使得 STING 通过 MAVS 与 RLR 相互作用，实现 RLR 介导的信号通路。尽管大部分数据支持 STING 定位于内质网，但由于 MEMs 处内质网与线粒体融为一体，很难明确揭示 STING 在此处的亚细胞定位。STING 上既有内质网滞留信号又有线粒体定位信号，很可能 STING 与 MAVS 就是在这里持续相互作用，而病毒刺激加强这种相互作用使 RIG- I 通过 MAVS 与 STING 相互作用并在线粒体外膜形成 RIG- I -MAVS-STING 复合体。我们实验室在研究冠状病毒 NL63 木瓜样蛋白酶 PLP2 逃避天然免疫机制时发现，PLP2-TM 能抑制过表达 MAVS/STING 激活的干扰素通路且具有剂量依赖效应，随着对 PLP2-TM 与 MAVS-STING-IKK ϵ 间相互作用影响的探究，发现 PLP2-TM 不仅破坏 STING 二聚化而且破坏 MAVS 与 STING/IKK ϵ 间相互作用，从而揭示 PLP2-TM 负调控天然免疫的相关机制^[27]。

WDR5 是一种色氨酸 - 天冬氨酸重复序列蛋白，其可以甲基化组蛋白 H3 中第 4 位赖氨酸，并与 MAVS C 端 TM 结构域相结合^[28]。Wang 等^[27]研究发现，生理条件下定位于细胞质的 WDR5 较细胞核多，内源性免疫共沉淀表明 WDR5 在生理条件下与 MAVS 相互作用，而病毒感染后细胞核中 WDR5 减少，这一结果表明病毒感染可将细胞核中 WDR5 转移至线粒体上，同时 MAVS 与 WDR5 的相互作用呈病毒感染依赖性。与此相似的是病毒感染后 WDR5 与 TRAF3 相互作用也增强，而其与 TRAF6 却持续相互作用，但在病毒感染 12 h 后这些相互作用都减弱。由此可见，病毒感染可以促进 WDR5 与 MAVS、TRAF3 相互作用^[29]。这一研究结果不禁引起人们对 WDR5 定位的思考，Wang 等^[27]发现 WDR5 被敲除，用病毒感染细胞 IRF3、NF- κ B 及 IFN- β 被抑制，但其只是抑制 RIG- I、MAVS 和 STING，而不是抑制 TBK1 介导的信号通路。敲除 WDR5 并不抑制 RIG- I 和 STING 的表达，表明 WDR5 作用于 RIG- I 和 STING 下游、TBK1 上游。过表达 WDR5 不能激活 IRF3/NF- κ B 转录，但敲除 WDR5 会引起 RIG- I 和 STING 在线粒体上表达水平下调，而不影响两者细胞总体水平表达。此现象揭示 WDR5 是招募 RIG- I 和 STING

至线粒体外膜 MAVS 复合体的关键分子. 敲除 WDR5 会影响 MAVS 与 TRAF3/TRAFF6 间相互作用, 但二者表达水平不随着 WDR5 的敲除呈现明

显变化, 由此可见 WDR5 不影响 TRAF3/TRAFF6 的招募^[29]. 图 2 总结了 MAVS 介导的 RIG-I 信号通路激活与调控作用^[30-31].

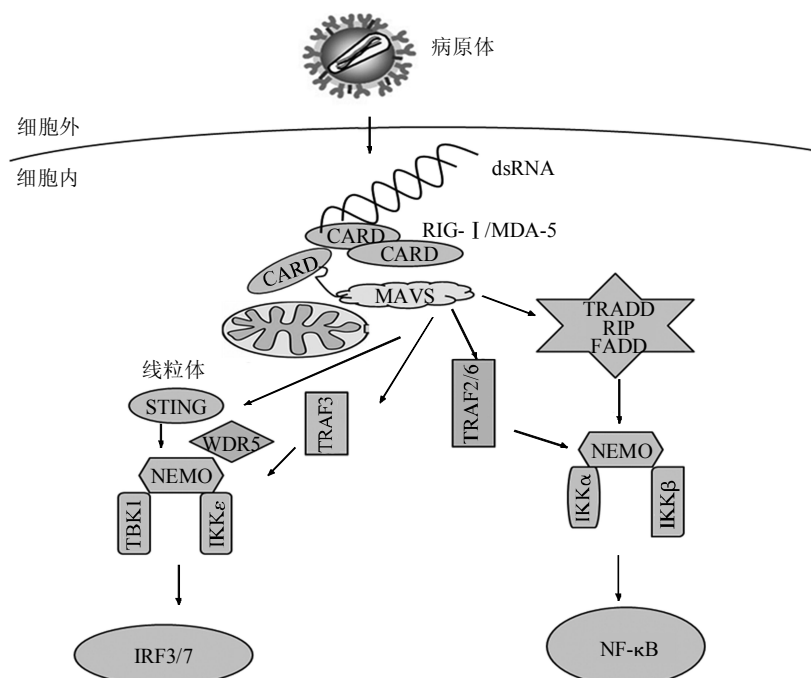


Fig. 2 Activation and regulation of RIG-I pathway mediated by MAVS

图 2 MAVS 介导的 RIG-I 信号通路的激活与调控

2.2 MAVS 对 TLR3 信号通路的调节作用及机制

MAVS 可通过 PRR 与含 Toll 受体结构域的衔接蛋白 (Toll-receptor-domain-containing adaptor) 相互作用, 主要是 TLR3 通路. MAVS 可以与 TRAF2 和 TRAF6 相互作用, 而 TRAF2 和 TRAF6 同时参与 TNF 受体和 TLR 家族介导的信号通路. 研究发现, 在 HEK293 细胞中用 siRNA 沉默 MAVS, 则 poly(I:C) 诱导的 NF-κB、ISRE 和 IFN-β 活化明显受到抑制, 而 LPS 诱导的 NF-κB 和 ISRE 活化以及 TNF 诱导的 NF-κB 活化并未被抑制. 由此可见, MAVS 参与 TLR3 介导的信号通路^[9].

Xu 等^[9]通过内源性相互作用发现, MAVS 可以与 TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β) 和 TRAF6 相互作用, 且这种相互作用不易受 poly(I:C) 影响. 同时外源性实验也发现, MAVS 可以与 TRIF、TAK1、TBK1、IRF3 和 IRF7 相互作用, 由此可见 MAVS 是一种支架蛋白, 与 TLR3 介导信号通路中多种蛋白质存在联系, 并与其他蛋

白质一起参与 NF-κB 活化过程. 为明确 MAVS 的作用, Xu 等^[9]发现, 在野生型和 TRIF 缺失小鼠体内, 过表达 MAVS 均可以激活 NF-κB 和 ISRE; 但是用 siRNA 沉默 MAVS 后 TRIF 诱导的 ISRE 活化受到抑制, 因此认为 MAVS 作用于 TRIF 下游. 在野生型与 TRAF6 缺失小鼠体内过表达 MAVS, NF-κB 的活化程度有所减弱但 ISRE 的活化未出现明显变化, 但当 IRF3 被突变后, ISRE 的活化受到抑制. 同时当 MAVS 被沉默后, 过表达 TRIF 和 TBK1 介导的 ISRE 活化均被抑制, 因此表明 MAVS 作用于 TRIF 下游、IRF3 上游.

TLR3 通路中 IRF3 活化主要依赖于 TRIF 途径, TRIF 不仅与 TRAF6 相互作用而且与 TBK1 和 IKKε 相互作用. 有研究发现, 泛素化连接酶 TRAF3 是连接 TRIF 与 TBK1 和 IKKε 的桥梁分子, 其可介导 TRIF 与 TBK1 之间的结合, 从而形成 TRIF-TRAF6-TRAF3-TBK1/IKKε 复合体, IRF3 被 MAVS 招募至 TRIF 复合体, 并被 TBK1/IKKε 磷酸化从而激活 IRF3 通路^[9]. TRIF N 端和 C 端分

别可与 TRAF6 和 RIP1 相互结合, RIP1 被 K63 连接泛素化修饰后可活化下游分子 TAK1, 并形成 TRAF6-RIP1-TAK1 复合体, 此复合体在激活 NF- κ B 通路中具有重要作用, 可以增强 IKK 复合

体活性^[23]. TRIF 缺失后, MAVS 便通过此途径完成信号转导从而激活 NF- κ B 通路. 图 3 归纳了 MAVS 参与 TLR3 信号通路的调节机制^[31].

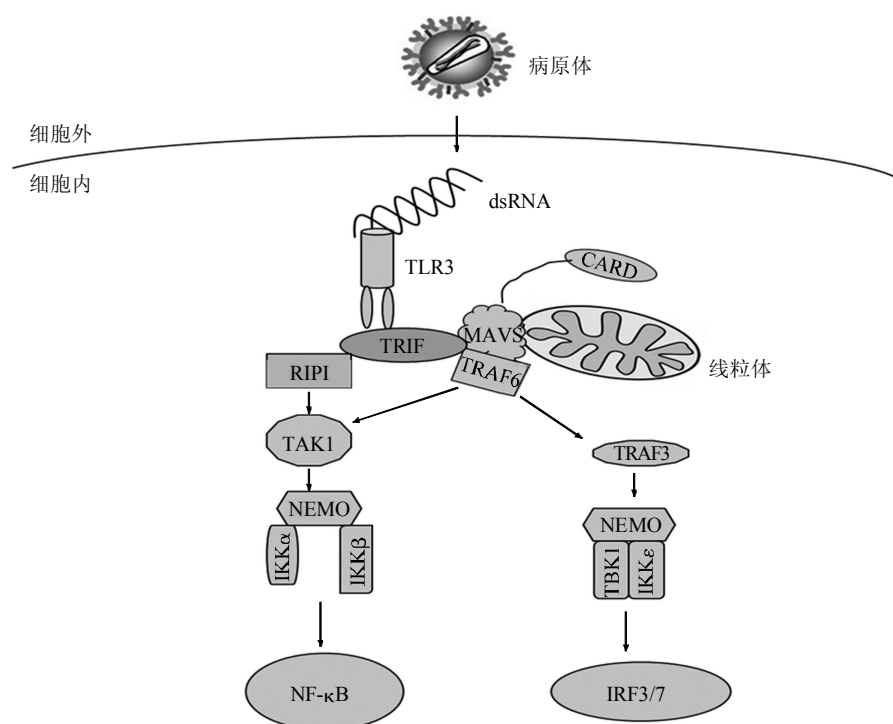


Fig. 3 MAVS regulates the TLR3 pathway

图 3 MAVS 参与调节的 TLR3 信号通路

2.3 MAVS 对细菌 RNA 介导信号通路的调节作用及机制

众所周知, 病毒 RNA 可以激活 RIG-I 通路, 与此相似的是, 有些细菌 RNA 也含有 RIG-I 配体结构, 即 5'-三磷酸二级结构. 但是, 大肠杆菌中分离出来的 RNA 只能诱导促炎症细胞因子而不能诱导 IFN- β . 于是 Chen 等探究了共生菌 RNA 是否通过 RIG-I-MAVS 通路诱导 IFN- β 的表达. 提取小鼠粪便中 RNA 并转染 HEK293 细胞, 发现其可激活 IFN- β , 但用碱性磷酸酶 SAP(可去除 5'-ppp 或使双链 RNA 降解)处理后这种作用减弱^[31-32]. 转染小鼠排泄物 RNA 至野生型 HEK293 细胞, 发现细胞内干扰素通路被激活, 而对照组鼠肝脏 RNA 却没有此现象产生. 此结果提示, 5'ppp 和 dsRNA 片段是小鼠排泄物 RNA 激活 RIG-I 必需的. Chen 等分别提取抗生素治疗小鼠和无菌小鼠排泄物中 RNA, 发现这两种情况下 RNA 量明显低于正常排泄物中 RNA 量, 即使使用等量 RNA, 抗生素处理

后的小鼠排泄物 RNA 也丧失干扰素诱导活性, 说明共生菌 RNA 在激活干扰素通路中起着重要作用. 进一步发现骨髓衍生的巨噬细胞中细菌诱导量呈 MAVS 依赖性. 以上结果提示, 共生菌 RNA 可作 RIG-I 配体并可通过 MAVS 诱导干扰素通路^[32].

3 MAVS 信号通路的负调控机制

3.1 调节 MAVS 的修饰

PLK1 (Polo-like kinase 1) 是含 Polo-box 结构域 (PBD) 的一种有丝分裂 Polo 样激酶. MAVS N 端具有 S233 和 T234 两个磷酸化位点, PBD 与其结合从而磷酸化 MAVS. PLK1 也可以与 MAVS C 端结构域相互作用, 破坏 MAVS 与其下游 TRAF3 分子相互作用并负调控干扰素通路^[33].

3.2 阻断 MAVS 与相关信号分子的相互作用

Mfn2 (Mitofusin 2) 是介导线粒体融合的蛋白质之一, 可以通过中心 HR1 (43 hydrophobic heptad region) 疏水结构域与 MAVS 相结合, 抑制 RLR 通

路。Mfn 2 不是影响 MAVS 数量, 而是阻止信号向下游分子传递, 进而降低或阻止 IRF3 的二聚化和 IFN- β 的表达^[34]。与 Mfn2 作用机制相似的还有 NLRX1^[35]和 gC1qR^[36], 但 gC1qR 是通过与 MAVS 的相互作用来阻断 RLR 与 MAVS 的相互作用, 而不影响 MAVS 与下游信号分子的相互作用。

3.3 MAVS 分子的降解

RNF5 是定位于线粒体和内质网的另一种 E3 泛素连接酶, 其 N 端(氨基酸 1~168)和 C 端(氨基酸 51~180)都可以与 MAVS 的 TM 结构域相互结合, RNF5 通过泛素-蛋白酶体途径将 MAVS 降解。与 PCBP2 不同的是病毒感染后 RNF5 的表达水平并未发生明显变化, 当 RNF5 被敲除后 MAVS 的表达量仍然降低, 但降解速度降低, 表明 RNF5 并不是唯一参与 MAVS 降解的蛋白质^[37]。

PCBP2 是位于 PSMA7 上游的一种蛋白质, 可以与 MAVS 相互作用。病毒感染后, PCBP2 水平上调, 从而靶向 MAVS 并通过泛素连接酶将其降解^[38], 接着, PCBP2 招募 HECT E3 连接酶 AIP4 至 MAVS 上, 引起 MAVS 泛素化和降解。诸如此类还有 E3 泛素连接酶 AIP4 和蛋白酶体的一个亚单位 PSMA7^[39]。

3.4 病毒编码的 MAVS 负调控分子

NS3/4A 是丙肝病毒编码的一种丝氨酸蛋白酶, 其可裂解 MAVS 第 508 位半胱氨酸, 将 MAVS 切割成两个大小不等分子, 使其不能定位于线粒体并破坏其寡聚化而失去激活下游信号的功能, 从而阻断 RLR 介导的信号通路^[4, 40]。除丙肝病毒编码的 NS3/4A 以外, 甲肝病毒编码的 3ABC (3C^{pro} 半胱氨酸蛋白酶的前体) 和乙肝病毒编码的一种 X 蛋白 HBX 均可以裂解 MAVS 从而阻断信号转导^[7, 41]。本课题组多年来从事抗病毒天然免疫调节分子机制研究, 较系统地阐明了冠状病毒通过 PLP 蛋白调节宿主抗病毒天然免疫的新机制。最新研究发现^[27], 人类冠状病毒 NL63 PLP 蛋白酶通过破坏 MAVS-STING-TBK1/IKK ϵ 复合体, 阻断抗病毒天然免疫信号通路中重要调节蛋白 MAVS 和 STING 功能的发挥, 并负调控宿主抗病毒天然免疫, 从而揭示 PLP 蛋白酶调节宿主抗病毒天然免疫的另一种新机制。

4 总结与展望

本文主要回顾 MAVS 分子的发现、结构、定位及对细胞天然免疫信号通路的调控机制。病毒感染宿主后会活化 MAVS 使其构象改变, 进而募集

下游相关分子, 通过级联反应最终活化 NF- κ B 和 IRF3 等相关信号通路, 诱导 I 型干扰素(α 和 β) 和其他相关因子的表达以及细胞天然免疫反应。目前, 对于这个线粒体抗病毒蛋白的探索依然存在许多问题, 如: 线粒体大量存在于植物、动物和酵母细胞中, 但是只有高级哺乳动物细胞中才发现具有免疫调节功能的 MAVS, 尚未在酵母属和果蝇属中发现与 MAVS 同源结构域, MAVS 在天然免疫系统的进化过程依然值得继续探讨。另外, 尽管已知 MAVS TM 结构域具有靶向定位作用, 但是 MAVS 动态地定位于线粒体和过氧化物酶体的原因仍不甚明了。已经有研究证明当 MAVS 定位于内质网膜或细胞质中时, 其功能接近丧失, 当其定位于线粒体外膜与过氧化物酶体时, 其自身及结合的其他信号蛋白均能发挥最大作用, 但是具体时空机制仍不明确。此外, 由线粒体及 MAVS 介导的细胞内天然免疫网络还有待细化和完善, 例如: MAVS 与下游信号分子的具体作用机理; 缺失某些中间蛋白能否封闭 MAVS 功能; MAVS 是否只作用于 NF- κ B 或 IRF3 信号通路等。对这些过程机制的揭示有助于我们进一步研究病毒与宿主的相互调节, 更深层地明确 MAVS 在细胞内抗病毒天然免疫中的作用和详细机制, 深入阐明细胞内天然免疫信号通路及病毒逃避宿主天然免疫的分子机制, 也为研究以 MAVS 为靶点的新型抗病毒治疗提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Inter Rev Immunol*, 2011, **30**(1): 16-34
- [2] Seth R B, Sun L, Ea C K, *et al.* Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF3. *Cell*, 2005, **122**(5): 669-682
- [3] 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
- [4] 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
- [5] Xu L G, Wang Y Y, Han K J, *et al.* VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*, 2005, **19**(6): 727-740
- [6] Paz S, Vilaso M, Werden S, *et al.* A functional C-terminal TRAF3-binding site in MAVS participates in positive and negative regulation of the IFN antiviral response. *Cell Res*, 2011, **21** (6): 895-910
- [7] Koshiba T. Mitochondrial-mediated antiviral immunity. *Biochim*

- Biophys Acta, 2013, **1833**(1): 225–232
- [8] Potter J A, Randall R E, Taylor G L. Crystal structure of human IPS-1/MAVS/VISA/Cardif caspase activation recruitment domain. BMC Stru Biol, 2008, **8**: 11
- [9] Hou F, Sun L, Zheng H, *et al.* MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. Cell, 2011, **146**(3): 448–461
- [10] Gander-Babbe S, van der Bliek A M. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. Mol Biol Cell, 2008, **19**(6): 2402–2412
- [11] Koch A, Yoon Y, Bonekamp N A, *et al.* A role for Fis in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. Mol Biol Cell, 2005, **16**(11): 5077–5086
- [12] Dixit E, Boulant S, Zhang Y, *et al.* Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. Cell, 2010, **141**(4): 668–681
- [13] Horner S M, Liu H M, Park H S, *et al.* Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(35): 14590–14595
- [14] Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy A A, *et al.* Structural basis for the activation of the innate immune pattern recognition receptor RIG- I by viral RNA. Cell, 2011, **147**(2): 423–435
- [15] Baril M, Racine M E, 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
- [16] Loo Y M, Gale Jr M. Immune signaling by RIG- I -like receptors. Immunity, 2011, **34**(5): 680–692
- [17] Tanaka Y, Chen Z J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. Sci Signal, 2012, **5**(214): ra20
- [18] Li S, Wang L, Berman M, *et al.* Mapping a dynamic innate immunity protein interaction network regulating type I interferon production. Immunity, 2011, **35**(3): 426–440
- [19] Clark K, Pegg M, Plater L, *et al.* Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity. Biochem J, 2011, **434**(1): 93–104
- [20] Wang L, Li S, Dorf M E. NEMO binds ubiquitinated TANK-kinase 1 (TBK1) to regulate innate immune responses to RNA viruses. PLoS ONE, 2012, **7**(9): e43756
- [21] Michallet M C, Meylan E, Ermolaeva M A, *et al.* TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. Immunity, 2008, **28**(5): 651–661
- [22] Ishikawa H, Barber G N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. Nature, 2008, **455**(7213): 674–678
- [23] Lin R, Paz S, Hiscott J. Tom70 imports antiviral immunity to the mitochondria. Cell Res, 2010, **20**(9): 971–973
- [24] 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
- [25] Sun W, Li Y, Chen L, *et al.* ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, **106**(21): 8653–8658
- [26] Jin L, Waterman P M, Jonscher K R, *et al.* MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. Mol Cell Biol, 2008, **28**(16): 5014–5026
- [27] Sun L, Xing Y, Chen X, *et al.* Coronavirus papain-like protease negatively regulate antiviral innate immune response through disruption of STING-mediated Signaling. PLoS ONE, 2012, **7**(2): e30802
- [28] Wysocka J, Swigut T, Milne T A, *et al.* WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. Cell, 2005, **121**(6): 859–872
- [29] Wang Y Y, Liu L J, Zhong B, *et al.* WDR5 is essential for assembly of the VISA-associated signaling complex and virus-triggered IRF3 and NF-kappaB activation. Proc Nat Acad Sci USA, 2010, **107**(2): 815–820
- [30] Chen H, Jiang Z. The essential adaptors of innate immune signaling. Protein and Cell, 2013, **4**(1): 27–39
- [31] Zemirli N, Arnoult D. Mitochondrial anti-viral immunity. Inter J Biochem Cell Biol, 2012, **44**(9): 1473–1476
- [32] Li X D, Chiu Y H, Ismail A S, *et al.* Mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) monitors commensal bacteria and induces an immune response that prevents experimental colitis. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(42): 17390–17395
- [33] Vitour D, Dabo S, Ahmadi Pour M, *et al.* Polo-like kinase 1 (PLK1) regulates interferon (IFN) induction by MAVS. J Biol Chem, 2009, **284**(33): 21797–21809
- [34] Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, *et al.* Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. Sci Signal, 2009, **2**(84): ra47
- [35] Allen I C, Moore C B, Schneider M, *et al.* NLRX1 protein attenuates inflammatory responses to infection by interfering with the RIG- I -MAVS and TRAF6-NF-kappaB signaling pathways. Immunity, 2011, **34**(6): 854–865
- [36] 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
- [37] Zhong B, Zhang Y, Yang Y, *et al.* The E3 ubiquitin ligase RNF5 targets virus-induced signaling adaptor for ubiquitination and degradation. J Immunol, 2010, **184**(11): 6249–6255
- [38] You F, Sun H, Zhou X, *et al.* PCBP2 mediates degradation of the adaptor MAVS via the HECT ubiquitin ligase AIP4. Nat Immunol, 2009, **10**(12): 1300–1308
- [39] Jia Y, Song T, Wei C, *et al.* Negative regulation of MAVS-mediated innate immune response by PSMA. J Immunol, 2009, **183**(7): 4241–4248
- [40] Parera M, Martrus G, Franco S, *et al.* Canine hepatitis virus NS3 serine protease can cleave the human adaptor proteins MAVS and TRIF. PLoS ONE, 2012, **7**(8): e42481
- [41] Mukherjee A, Morosky S A, Delorme-Axford, *et al.* The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. PLoS Pathog, 2011, **7**(3): e1001311

Functions and Regulation of MAVS, The Mitochondrial Antiviral Signaling Protein in Innate Immunity*

YANG Xing-Xing^{1,2}, WANG Kai¹, CHEN Xiao-Juan¹, XING Ya-Ling¹, CHEN Zhong-Bin^{1,2}**

(¹Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China; ²Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract The mitochondrial antiviral signaling adaptor, MAVS, also known as Cardif, VISA or IPS1, is critical for host defenses against viral infection by inducing expression of type-1 interferons (IFN- I). The sensors of antiviral immunity, RIG- I and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), detect the invasion pathogens, and pass the signal to MAVS, which is anchored to the mitochondrial membrane. MAVS then stimulates TBK1 and IKK complex and activates the transcription factors of IRF3/7 and NF-κB, which lead to the expression of interferon and activate antiviral innate immunity. MAVS was recently found to localize in both peroxisome and mitochondrial membrane. The peroxisomal MAVS is required for the rapid induction of antiviral effectors, whereas the mitochondrial MAVS is required for a sustained antiviral immunity response. This review focused on the discovery, domain structure and cellular localization of MAVS with an emphasis on the regulatory mechanisms of MAVS in modulating the antiviral innate immunity.

Key words MAVS, innate immune, type I interferon, RIG- I , TLR

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00513

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81172799, 81273231).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-66930297, Fax: 86-10-88272105, E-mail: chenzb@bmi.ac.cn or chenzhongbin@yahoo.com

Received: October 21, 2012 Accepted: February 1, 2013