

新型胞质 DNA 感受通路: cGAS-STING 的研究进展*

丁 亮¹⁾ 泥艳红^{1, 2)**} 胡勤刚²⁾ 侯亚义¹⁾

(¹⁾ 南京大学医学院免疫学实验室, 南京 210093; (²⁾ 南京大学口腔医学院, 南京大学医学院附属口腔医院, 南京 210093)

摘要 细胞胞质中存在的游离 DNA 一直被宿主的固有免疫系统当做潜在的危险信号, 但免疫系统识别和清除这些危险信号的机制还不明确。近几年有研究发现, DNA 感受器(DNA sensor)是宿主感受 DNA 和免疫防御的桥梁, 目前已经有超过 10 种 DNA 感受器被发现, 而干扰素刺激基因(stimulator of interferon genes, STING, 也称为 TMEM173、MPYS、MITA 和 ERIS)作为一种 DNA 感受通路下游关键的接头分子, 在感受胞质 DNA 和免疫防御方面起着重要的信号传递作用, 胞质中的 DNA 可通过 DNA 感受器激活 STING, 再激活 I 型干扰素和其他细胞因子, 进而启动机体的免疫反应。近些年, 胞质中游离 DNA 如何激活 STING, 进而如何在体内启动免疫反应以产生抗病毒或抗菌作用的机制研究取得了显著进展。最近, 在哺乳动物细胞中发现了一种新型的核酸转移酶 cGAS (cyclic GMP-AMP synthase), 它能识别 DNA 并能产生一种内源性的环化二核苷酸 cGAMP (cyclic GMP-AMP)激活 STING。本文将最近关于 cGAS 的发现、胞质 DNA 通过 cGAS 激活 STING 及 STING 活化后激活机体免疫反应的机制进行了综述。

关键词 干扰素刺激基因(STING), 核酸转移酶(cGAS), 抗感染免疫, DNA 感受器

学科分类号 R392, Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00497

固有免疫系统运用一系列称为模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)的病原识别受体监视胞外危险信号、内涵体(endosome)及胞质的非己成分(即病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs))和自我成分(即损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)), 如 LPS、细菌的鞭毛蛋白、环化二核苷酸(cyclic dinucleotides, CDN, 包括 cdA、cdG、cAMP-GMP)、CpG DNA、富含 AT 的 DNA、dsDNA、ss DNA 等^[1-4]。PRR 可针对病原体或自身的组织损伤产生适度的免疫应答, 而进入细胞胞质的 DNA 被机体认为是一种病原体感染的危险信号, 若胞质 DNA 不能被合理清除则会积累在胞质, 将引发病理性炎症和自身免疫病, 如系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)和 Aicardi-Goutieres 综合征(AGS)^[5-6]。第一个被发现的 PRR 是定位于胞质内涵体(endosome)上的 Toll 样 9 受体(toll like receptor, TLR9), 它能够应对胞外或内涵体(endosome)的 PAMP 和 DAMP(如 SLE

患者体内细胞中积累的损伤 DNA)通过激活 MyD88 途径产生 I 型干扰素^[7]。与此类似的受体还有 DNA 结合蛋白(DAI)、RNA 聚合酶 III (RNA pol III)、解旋酶 36 (DHX36)、干扰素诱导蛋白 16 (IFI16/p204)、DNA 依赖的蛋白激酶亚基(Ku70)、DDX41 等^[8-13]。最近在哺乳动物细胞中发现了一种新型 DNA 感受器(DNA sensor)即 cGAS (cyclic GMP-AMP synthase, 又称为 C6orf150 或 MB21D1), 是一种核酸转移酶, 它能产生内源性的 CDN: 2'-3' cyclic AMP-GMP, (cGAMP), 进而激活干扰素刺激基因(stimulator of interferon genes, STING)。STING 是 DNA 感受通路中的一个关键蛋白, 对于

* 国家自然科学基金资助项目(81072213, 81271698), 国家临床重点专科建设项目(2011), 江苏省临床医学科技专项(BL2012017), 南京市医学重点实验室建设项目(2012)和南京市医学科技发展项目(YKK09124)。

** 通讯联系人。

Tel: 025-83620140, E-mail: niyanhong12@163.com

收稿日期: 2013-12-10, 接受日期: 2014-02-17

固有免疫和适应性免疫启动具有重要作用^[14-19], 但胞质内外的危险信号如何通过 cGAS 传递至 STING 启动机体免疫反应的相关知识仍不够系统. 本文从目前国内外对 cGAS-STING 通路在应对胞质内外危险信号中的作用进行总结.

1 STING 能够直接或者间接识别 dsDNA

最初, 几个研究团队在运用过表达的方法筛选能够诱导 IFN- β 的蛋白时, 发现了 STING 蛋白, 其主要定位于内质网(ER)和线粒体上^[20-22]. STING 蛋白 N 端由约 130 个氨基酸组成, 形成 4 个跨膜结构域(TM1~4), 使 STING 能够锚定于 ER 上. 剩下的约 250 个氨基酸组成 C 端结构域(C-terminal domain, CTD), 对 STING CTD 的晶体结构进行研究发现, 之前普遍认为是第 153~173 位氨基酸区域并不属于跨膜结构域, 而是 STING 的二聚化结构域(dimerization domain, DD). 因此由第 138~379 位氨基酸组成的 CTD 主要包括两个结构域: 二聚化结构域和剩下的面向胞质的结构域. 二聚化结构域高度保守, STING 应对胞质 dsDNA 或者 CDN 可能是通过其二聚化出现胞质离散灶(discrete foci)的重新定位进而实现其活化功能的. 研究认为当 STING 活化时会在核外周形成点状结构, 而没有活化的则定位在内质网或者线粒体上^[21]. 有研究认为, 第 340~379 位氨基酸是 C 端尾, 即 CTT, 面向胞质, 它可能起着对 STING 自我抑制的作用. Tanaka 等发现在胞质存在 dsDNA 或者 CDN 时, 该结构域对于 STING 招募 TBK-1 以及后者活化干扰素通路是必需的. 此外, 通过对 cdG-二聚化 STING 的晶体结构研究发现, 第 152~343 位氨基酸结构域对于 cdG 与 STING 二聚体的结合则是必需的, 而 Tyr167 和 Glu260 两个位点被认为是其与 c-di-GMP 结合的两个重要位点(图 1)^[23-26].

前期研究者主要认为 STING 可以直接识别细胞质中的 cdG、cdA、cGAMP 等, 但是对于 STING 是否能够直接识别 dsDNA 这个问题一直没有解决. 后来 Abe 等^[23]的最新研究证明了 STING 能够直接识别细胞质中的 dsDNA, 虽然它们的亲和力不如 STING 对 CDN 的强. 此外, 他们发现, 对于 STING 直接识别 dsDNA 有重要作用的是第 242~341 位氨基酸结构域, 而且与 dsDNA₉₀ 相比, ssDNA 和 poly(A:T)能够竞争性地结合 STING, 所以 ssDNA 也可以与 STING 结合, 激活 STING. 虽然 STING 能够直接结合 dsDNA, 但是亲和力较

低, 然而胞质 DNA 同 CDN 一样能高效激活 STING, 说明 STING 上游存在一些信号接头分子, 它们能够把胞质 DNA 危险信号转换并且高效激活 STING, 而最新发现的 cGAS 蛋白就是很好的例子.

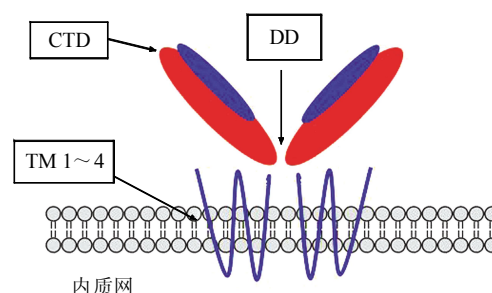


Fig. 1 The structure of dimeric STING

图 1 STING 二聚体的结构示意图

2 CDN 和 cGAS 的发现及功能

1987 年, 在 CDN 作为革兰氏阴性菌纤维素合成酶的激活剂被科学家发现后, 人们发现两个 GMP 分子在鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclases, DGC)和磷酸二酯酶(phosphodiesterases, PDEs)的催化作用下能形成两个 3'-5'磷酸二酯键, 形成环化鸟核苷酸(cyclic di-GMP, cdG)^[2]. 现在研究表明, cdG 参与细菌的很多生物学反应, 细菌感受外界环境刺激时能够通过调节 cdG 的水平来调节 O₂ 和 NO 的产生、光通量、氧化还原状态以及细胞周期运转, 除此之外, 它在细菌的毒性、致命性、生物膜合成、抗生素的产生等方面也发挥重要作用^[27].

最近研究发现, 与革兰氏阴性菌中的 cdG 相似, 在革兰氏阳性菌中环化腺苷酸(cyclic di-AMP, cdA)也发挥着重要功能, 因为催化 cdA 形成的腺苷酸环化酶(diadenylate cyclases, DACs)中的关键结构域在多种细菌中都能被发现, 并且和一些功能未知的结构域融合, 这说明 cdA 和 cdG 一样可能存在多种多样的调节功能^[28]. Luo 等^[29-30]发现, 过表达 cdA 磷酸二酯酶能够降低 cdA 的合成, 并且增加枯草芽孢杆菌对氨苄青霉素的敏感性, 而腺苷酸环化酶缺陷的菌株也出现对氨苄青霉素抗性降低的现象.

随后, 科学家在霍乱弧菌中发现了一种参与其致病性的新型结构 CDN: 环化的 GMP-AMP 即 cGAMP, 由一种二核苷酸环化酶催化寡核苷酸之

间形成两个 3'-5' 磷酸二酯键^[31], 此外, 还发现这种酶与人寡腺苷酸合成酶(oligoadenylate synthase, OAS1)类似, 都属于核酸转移酶这个大家族, 其中也包括腺苷酸环化酶. 运用生化纯化和重建策略, Wu 等^[32]发现, 当 DNA 暴露于哺乳动物细胞的细胞质时, 在细胞质中能产生环化鸟苷酸-腺苷酸(cyclic GMP-AMP, cGAMP), 其结构与 cdG 和 cdA 相似. 随后在质谱和经典的蛋白质纯化手段下, 他们识别出一种催化 cGAMP 合成的酶, 由一段未知的鼠源基因 E330026A19 编码, 并把它命名为 cGAMP 合成酶, 也就是 cGAS, 由 cGAS 催化形成的 cGAMP 能够激活 STING, 上调 I 型干扰素通路进行抗菌反应. Sun 等^[33]运用干扰 RNA 的办法沉默 L929 细胞系中的 cGAS, 结果 L929 细胞应对胞质 DNA 的抗病毒反应被大大削弱, 产生 IFN- β 的能力受到严重抑制, 而在 L929-sh- cGAS 细胞系中通过重新高表达 cGAS 又可以恢复 IFN- β 的产生. 随后对 STING 的敲除实验表明, 在 STING 缺陷的情况下, 表达 cGAS 或者直接将 cGAMP 导入细胞质都不能有效激活 IFN- β 的产生, 由此确定 cGAS 在 STING 依赖的 DNA 感受通路中的关键作用. 他们还阐明了 cGAS-STING 之间如何活化的部分机制: cGAS 可以结合细胞质中的 DNA, 并催化形成 cGAMP, 而后者能够有效激活 STING. 随后, Li 等^[34]对 cGAS 如何识别 dsDNA 并活化 STING 的具体机制做了相关研究, 他们提出 dsDNA 活化 cGAS 的一种模型: 纯化分离出来的 cGAS 为单聚体且不具有催化功能, 当 dsDNA 与其结合时, 将引起 cGAS 构象变化, 2 个 cGAS 蛋白相互交联形成一个二聚体, 2 个 dsDNA 可以形成 2:2 的复合体, 使 cGAS 活化. 在此过程中, 他们发现对复合体的形成至关重要的 2 个位点, 其中位点 A 在 cGAS 应对 DNA 引起的构象变化中发挥作用, 位点 B 主要在 cGAS 二聚体结合 DNA 的过程中起作用. 这种相互作用限制了 cGAS 结构的可变性, 也促进活化构象的稳定性. 这些研究成果为胞质 DNA 如何被感受及如何活化 STING 提供一条新的线索.

3 cGAS 通过 STING 应对胞质内外危险信号

自然界的 STING 存在不同的突变型, 人源 STING 包括 hSTING-H232 和 R232 两种类型, R232 型占大多数, 鼠源 STING 包括 mSTING-R231 和 A231 两种类型. 不同类型的 STING 应对

cGAMP 的反应不完全一致, 所以, 当时两个独立的团队在研究表达自然突变型 mSTING(R231A)的细胞应对胞质二核苷酸和外源性 cGAMP 诱导 IFN- β 时发现, 这种突变型对它们都不能产生应答或者低应答, 但是对 DNA 却保持正常的应答^[15-16]. 研究还发现, 人的自然突变型 hSTING(H232, 组氨酸 His 替代原有的精氨酸 Arg)对细菌的 cGAMP 不产生应答, 但是对 DNA 和 cGAS 信号应答没有影响. 这些由于使用了不同类型的 STING 和 cGAMP 产生的矛盾, 让科学家不能得到一致的结论去判定 STING 和 cGAS 的关系, 因此研究 STING 和 cGAMP 的不同类型结构, 即为什么让细胞应对胞质 DNA 产生不同的结果, 成为科学家亟需解决的难题.

在没有 cGAMP 所有异构体的参照下, 关于内源性 cGAMP 的 GMP 和 AMP 之间磷酸二酯键的确切性质还不清楚, 用质谱的方法还不能明确区分这些键. 随着化学和生物物理学的发展, 运用高效液相色谱、酶消化法、NMR 技术、化学合成和结构学技术, 有四个团队独立地发现内源性 cGAMP 的结构, 其中鸟苷酸和腺苷酸是通过 2'-5' GpA 连接 3'-5' ApG, 形成 2'-3' cGAMP, 不同于外源性 cGAMP 中的 3'-5' GpA 连接 3'-5' ApG 的结构, 这种结构能够结合于自然突变型的 hSTING(H232)并引发强有力的干扰素应答(图 2)^[15, 18-19, 35]. 这个发现给 STING 自然变体对经典的微生物来源的 cGAMP 不产生应答而对胞质 DNA 的应答没有影响, 提供了解释.

虽然内源性 cGAMP 的结构被破解, 但是 STING 对不同类型 cGAMP 结合的亲和力存在差异的这一问题仍然困扰着科学家. 比如 Zhang 团队^[19]发现, hSTING(R232)结合 2'-3' cGAMP 的亲和力要高于结合 3'-5' cdN, 他们测得 STING-2'-3' cGAMP 之间的亲和力大概是 STING-3'-5' cdG 或者 3'-5' cGAMP 的 300 倍. 而另外一个团队^[36]在测定 hSTING H232 和 R232 以及 mSTING R231 和 A231 对不同 cGAMP 的亲和力时, 发现不同类型的 STING 在与 2'-3' cGAMP、3'-5' cGAMP 结合时具有相似的亲和力. 并且活化 STING 时, 2'-3' cGAMP 与 3'-5' cGAMP 仅存在 2 倍之差, 但是引发的干扰素应答却相差 20~30 倍, 可能是由于细胞对不同类型 cGAMP 的摄取能力不同. 而对 cGAS、STING 的三维结构更深入的认识则会推动对这些现象的理解.

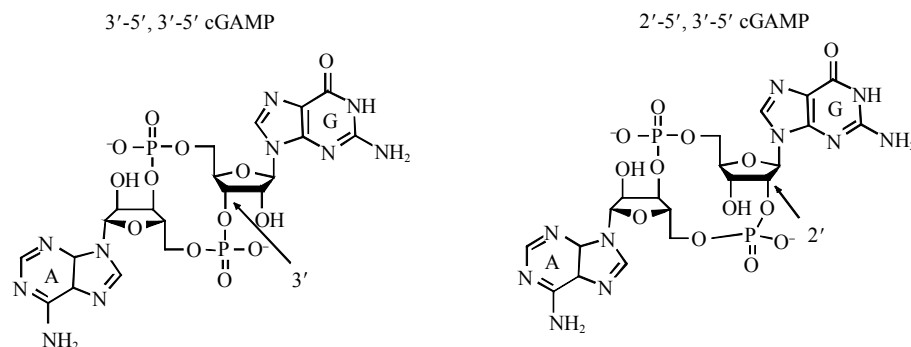


Fig. 2 Chemical structures of two types cGAMP

图 2 两种 cGAMP 的结构

现在已经知道 cGAS 是一个 60 ku 的蛋白, 包含一个由 150 个氨基酸组成的 N 端结构域, 这个结构域对蛋白酶敏感并且是非结构化的不保守的; 还含有一个具有蛋白酶抗性, 保守的核酸转移酶 (NTase) C 端结构域^[36]. 通过对其晶体结构的研究发现, 不同物种之间 cGAS 的核酸转移酶 (NTase) 结构域位置略有不同, 猪的是 135~497 位点, 鼠的是 147~507 位点, 人的是 157~522 位点. 而 cGAS 的二核苷酸合成酶活性是依赖于双链 DNA、 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 以及 ATP 和 GTP 的存在^[14, 34, 37].

该晶体结构显示, 催化 NTase 结构域折叠的过程与 RNA 感受器 2'-5'寡腺苷酸合成酶 1(OAS1) 的作用十分相似^[11]. 由于 cGAS 是沿着 DNA 小沟的糖-磷酸骨架相互作用, 所以确定了 cGAS 与双链 DNA 的相互作用是 dsDNA 序列非依赖性的. 当 cGAS 与 dsDNA 结合时, cGAS 使用锌指结构和带正电的表面拉拢 DNA, 在 Mg^{2+} 的作用下, 这样的结合会引起构象转变, 使得催化位点位置发生变化, 这样的变化可以催化形成 2'-5' GpA 连接和 3'-5' ApG 连接并最终形成 2'-3' cGAMP, 进而激活 STING^[38]. 当 STING 在“开放”状态下, 它并不会完全地包裹 cdA、cdG 以及细菌来源的 3'-5', 3'-5' cGAMP, 所以此时的 STING 结构比较松散, 只有一些无序的 loop 环覆盖在结合口, 从而不能活化 STING. 但是当 2'-3' cGAMP 结合 STING 时, 它会进入到 STING 二聚体形成的沟槽, 形成一个紧密的“关闭”状态, 并且由 4 个标准的 β 折叠覆盖结合沟槽上面, 并把 STING 从自我抑制状态释放出来, 通过其 CTT 来促进 TBK-1 和 IRF3 的

活化^[39]. 以其中的 cdG 为例, 晶体结构的研究显示, cdG 刺激 hSTING-H232 时, 只能诱导 STING 处于“开放”状态, 而 mSTING-R231 和 hSTING-H232 结合 2'-3' cGAMP 时, STING-cGAMP 复合物会形成一种“关闭”状态, 从而有效地激活 STING (图 3). 因此, 这可能从空间结构角度解释了为什么 CDN 不能活化 hSTING-H232, 但是可以活化 mSTING-R231 和 hSTING-H232 的现象.

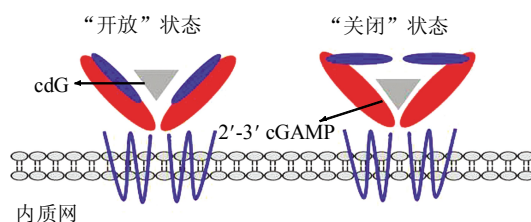


Fig. 3 Model of CDN binding to and activating STING

图 3 CDN 结合并活化 STING 的模型

4 cGAS-STING 通路在抗细菌和病毒感染中的新发现

病毒和细菌来源的病原 dsDNA 以及自身 DNA 都能诱导干扰素以及其他炎症因子 (如 IL-1 β 和 IL-6) 的产生^[40], 且细胞胞质过度积累的未消化完全的宿主 DNA 会引发自身不恰当的免疫攻击反应, 而 cGAS 作为一种新型的胞质 DNA 感受器, 能够时刻监视细胞质中不正常的 DNA 入侵或者积累.

因此, 研究 cGAS 感受细胞质中 dsDNA 并诱导免疫反应的机制对于抗病原感染或者自身免疫病是至关重要的。

当病原的 dsDNA 暴露于胞质时将引发固有免疫应答, STING-TBK-1-IRF3 这条通路在大多数应答胞质核酸(如 HIV、HSV-1、人巨细胞病毒(HCMV)、牛痘病毒(VACV)和杆状病毒)的研究中被认为是直接诱导 I 型干扰素产生的, 并认为是以 TLR 通路非依赖性的形式发挥作用。当 STING 被胞质 DNA 激活时, 它通过其 CTD 的 C 端尾 CTT 招募 TBK-1, 并为 IRF3 靠近 TBK-1 提供平台, 介导 TBK-1 依赖性的 IRF3 磷酸化, 随后磷酸化并且二聚化的 IRF3 入核激活下游转录因子(图 4)^[20, 41]。STING 作为抗病毒和抗微生物感染中重要的蛋白, 其抗感染作用已经被科学家慢慢了解, 但是关于 STING 如何被上游 DNA 感受器活化, 除了 cGAS 等, 还需要更多的研究探索去了解 STING 感受 DNA 之谜, 下面主要介绍 cGAS-STING 在体外和体内抗感染中的新进展。

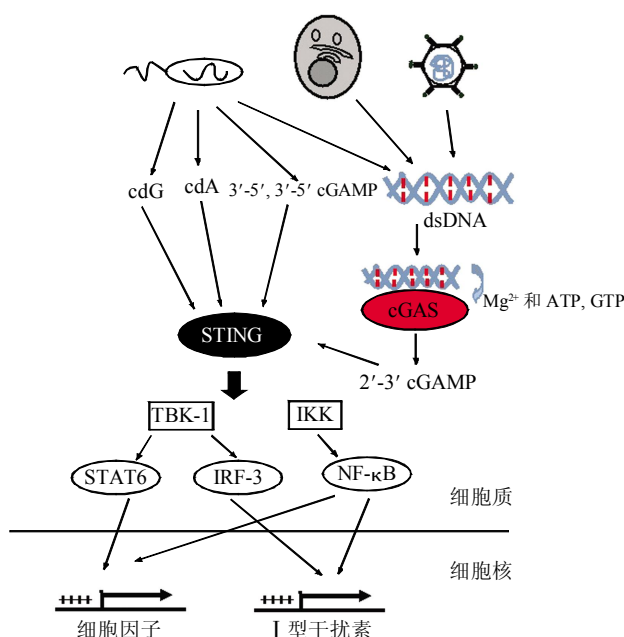


Fig. 4 STING-dependent induction of interferon

图 4 STING 依赖的干扰素诱导

4.1 cGAS-STING 在应对体外病毒感染中的作用

干扰素是机体抵抗病毒感染的重要细胞因子, 不仅干扰素本身能够有效地清除病毒感染的细胞, 其下游的干扰素诱导基因对于病毒感染进程的控制

也是至关重要的。因此, 筛选出能够有效进行抵抗一种或者多种病毒的干扰素基因将大大促进抗病毒研究的临床应用。在一项研究中使用 14 种病毒感染几株细胞系后, 检测活化的干扰素刺激基因即 ISG, 筛选超过 350 种 ISG, 结果显示有 47 种基因能够抑制一种或者多种病毒感染, 25 种基因能够提高病毒的侵染性, 并且发现有一种能够有效抑制多种病毒感染的蛋白质 cGAS, 不管在体内还是在体外都能有效控制多种病毒感染, 显示出 cGAS 出众的抗病毒作用^[42]。

腺病毒(adenovirus, Ad)感染细胞同其他病毒感染一样会引发细胞的抗病毒反应, 但是细胞质中能够感受腺病毒的感受器还没有被人们发现。最近一项研究发现, cGAS 作为一种新的 DNA 感受器能够识别腺病毒的胞质入侵, 敲除 cGAS、TBK-1、STING 都能抑制腺病毒感染引发的抗病毒反应, 并且由 I 型干扰素引发干扰素通路的活化也受到抑制, 其中包括 JAK/STAT 通路的 STAT1/2 的磷酸化程度降低以及干扰素诱导基因 IFN-β、ISG15、ISG54 的表达, 由此证明 cGAS 在胞内腺病毒的感受过程和随后的干扰素信号级连反应中的重要作用^[43]。

艾滋病的元凶是获得性免疫缺陷病毒(HIV), 在其入侵机体后, 会激活机体细胞内一系列 DNA 感受器的监视, 包括 RIG-1、IFI16 以及最新发现的 cGAS。前期研究发现, 在 HIV 的复制周期中会产生 RNA、单链 DNA、杂交的 RNA-DNA 以及双链 DNA, 而这几种核酸都是机体识别 HIV 的重要 PAMP。有研究发现, 机体存在一种识别 ssDNA 的 PRR 即 IFI16 能识别 HIV 的单链 DNA, 这种应答在以前是没有被发现的, 但是当机体识别 ssDNA 后, 与识别 dsDNA 一样, 也激活 STING 依赖的 TBK-1-IRF3 通路的活化^[44-48]。

最新的一项关于 HIV 感染的研究有力地说明了 STING 如何通过 cGAS 来感受 HIV 感染机体的过程。在人单核细胞系 THP-1 中, HIV 感染会活化胞质 cGAS 并通过它合成内源性 cGAMP, 激活接头蛋白 STING, 活化的 STING 通过招募 TBK-1, 磷酸化 IRF-3, 活化的 IRF-3 入核促进干扰素基因的转录, 产生 IFN-β 和 CXCL10 来控制病情。用 shRNA 沉默 cGAS 或者 STING 能强烈抑制 THP-1 细胞 IFN-β 和 CXCL10 的产生以及 IRF-3 的活化, 但是 RNA 类似物 poly(I:C)刺激 THP-1 细胞分泌干扰素的能力并不受影响。此外, 敲除小鼠

(L929)或者人来源的细胞系中(髓系来源的巨噬细胞, 即 MDM 和树突状细胞)的 cGAS 将阻断机体免疫系统针对 HIV、鼠白血病病毒或者猴免疫缺陷病毒诱导的干扰素应答, 因此这些研究证明了在体外 cGAS-STING 通路是病毒感染的重要感受途径^[49].

4.2 cGAS-STING 在应对体内病毒感染中的作用

关于 STING 的抗感染研究主要集中在细胞水平的验证, 并不能真实地反应它在机体内的作用, 因此进行体内实验对 cGAS-STING 通路重要功能的验证将有助于其在临床方面的应用. 而 Li 等^[50]通过建立 cGAS 双敲除的小鼠来研究在机体内 cGAS 的抗病毒特性是否和体外实验一致. 他们发现, 野生型的小鼠在感染 HSV 后, 其血清中 IFN- α 和 IFN- β 在 8 h 左右达到最高值, 而感染同样计量 HSV 的 cGAS^{-/-}小鼠其血清中的干扰素含量比野生型小鼠要严重降低, 并在 3 天后出现共济失调和瘫痪等症状, 随后便死亡, 而野生型小鼠直到第 6 天才开始出现相同症状. 同时, 研究人员取出野生型和敲除小鼠的大脑, 检测 HSV 的病毒滴度, 在感染的第 3 天, 所有的 cGAS^{-/-}小鼠的大脑都能检测出高水平的 HSV, 但是野生型的基本检测不到. 除此之外, cGAS^{-/-}小鼠的肺成纤维细胞、骨髓来源的单核细胞、Flt3L 诱导的树突状细胞在应对 DNA 模拟物或者 DNA 病毒时都表现出低应答的情况, 不能有效产生 I 型干扰素进行抗病毒反应. 通过以上研究证实在体内 cGAS-STING 也具有感受胞质 DNA 危险信号的突出作用.

4.3 cGAS-STING 在应对细菌 CDN 和 DNA 中的作用

STING 除了能在识别病毒感染过程中发挥作用外, 还能在抗菌方面体现感受胞质微生物核酸的功能. 当细菌入侵胞内时, 释放其 DNA 以及各种环化二核苷酸, 包括 cdA、cdG、cGAMP, 当 CDN 或者游离的 DNA 进入细胞胞质时, 前者可以直接激活 STING 进行快速的抗菌应答, 而后者可以在 cGAS 的作用下转化为内源性 cGAMP, 从而激活 STING, 进行病原的监控和即时的清除. 前期研究表明, 李斯特杆菌、弗朗西斯菌、布鲁氏菌、肺炎链球菌及衣原体等等都能激活胞质 TLR 非依赖的但是 STING 依赖的 I 型干扰素产生^[40]. 此外, 越来越多的证据显示除了细胞外生物膜成分, 一些细菌可以在宿主上皮细胞内形成一种含有多糖类的膜结构, 称为胞内菌落. 最近的研究证实, 尽管沙眼衣原体存在于膜结合的胞内菌落中,

STING 能够直接检测沙眼衣原体合成的 c-di-AMP. 这些发现也为 STING 识别来自细胞外危险提供了一种新途径, 即直接监视膜结合的含病原体的生物膜结构, 这样可以随时检查膜结构中微生物的特殊代谢物的释放, 并且上调 I 型干扰素通路来控制细菌感染^[51].

5 病原免疫逃逸中 cGAS-STING 的作用

随着免疫系统的进化, 许多病原体也进化出逃避免疫系统监视杀伤的策略, 比如一些病毒类, 如 HCV 的 NS3/4A 蛋白酶是病毒粒子组装的重要元件, 它能分别阻断由 RIG-I 向 MAVS/VISA 以及 TLR3 向 TRIF 传递的信号, 从而阻断下游干扰素通路的活化. 后来有研究者运用 BiFC(双分子荧光互补)的方法发现 HCV 的另一种蛋白酶 NS4B 能够直接靶向 STING, 废除 RIG-I 介导的 I 型 IFN 依赖的抗病毒反应^[52]. 但是最近的一项研究表明, NS4B 能够靶向 STING, 干扰其与 TBK-1 的作用, 从而削弱 IFN- β 的产生, 但是这里 NS4B 对 STING 自身的蛋白质表达和二聚化以及与 MAVS 的相互作用并没有显著影响^[53]. 感染登革热病毒(DENV)引起的一种急性传染病, 可以通过蚊子叮咬传播, 会出现内脏大出血. Aguirre 等^[54]研究发现, 在单核细胞来源的树突状细胞(monocyte derived dendritic cells, MDDCs)中 DENV 编码的 NS2B3 蛋白酶会靶向 hSTING, 并且导致其降解, 但是对于 mSTING 没有影响, 所以在鼠源细胞中 STING 可以强烈限制 DENV 的复制并诱导产生大量的干扰素.

6 总结与展望

人们一直认为胞质的 DNA 对免疫系统来说是一种危险信号, 但最近研究才开始慢慢探索出免疫系统如何感受 DNA 的分子机制, 尤其是对细胞应对细菌及病毒感染时如何诱导 I 型 IFN 产生已经做出部分解释. 本文主要介绍了最近发现的一种新型胞质 DNA 感受器 cGAS 以及它如何参与 STING 依赖的干扰素活化反应, 进行抗病原微生物感染的研究进展, 包括 STING 的二聚体结构和 cGAS 的结构. 另外, 对于 cGAS 如何识别胞质中不合适的 DNA 入侵或者积累也做了相关介绍, 最后, 还从晶体结构角度总结了 cGAS 识别 DNA 后如何激活胞质蛋白 STING 的解释以及一些抗病原感染的实例. 这些研究解释了 STING 如何识别内源性

cGAMP 的问题, 并且通过体内体外实验证明了 cGAS 在机体固有免疫中的重要作用和今后的应用前景. 我们实验室对此开展了一系列关于 STING 对固有免疫细胞在炎症中的趋化作用的实验, 初步发现它的活化对人源外周血单核细胞具有很强的趋化作用, 并进一步探索其在临床方面的应用.

虽然关于 STING 和上游 DNA 感受器的相互作用已经被人们逐渐了解, 但是还有许多问题未被解决, 最主要的就是现在很多关于 STING 的研究都是在小鼠模型或者细胞系中, 并且鼠源 STING 和人源 STING 应对 cGAMP 的能力存在差异, 鼠源 STING 的激动剂对人源 STING 并没有激活作用, 比如一种黄酮类化合物 DMXAA 在老鼠肿瘤模型中具有抗肿瘤作用, 它主要是靶向 mSTING, 激活 TBK-1 和 IRF3, 但是研究人员发现 DMXAA 并不能结合 hSTING, 所以它对于人类的肿瘤没有杀伤效果^[55]. 因此开发出能针对人的 STING 和 cGAS 的靶向药物对于慢性感染的治疗或者自身免疫病的改善具有十分重要的治疗前景.

参 考 文 献

- [1] Keating S E, Baran M, Bowie A G. Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends in Immunology*, 2011, **32**(12): 574-581
- [2] Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, *et al.* Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 1987, **325**(6101): 279-281
- [3] Ebsensen T, Libanova R, Schulze K, *et al.* Bis-(3', 5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant. *Vaccine*, 2011, **29**(32): 5210-5220
- [4] Kato H, Takahashi K, Fujita T. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol Rev*, 2011, **243**(1): 91-98
- [5] Leadbetter E A, Rifkin I R, Hohlbaum A M, *et al.* Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, 2002, **416**(6881): 603-607
- [6] Stetson D B, Ko J S, Heidmann T, *et al.* Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell*, 2008, **134**(4): 587-598
- [7] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, **408**(6813): 740-745
- [8] Ishii K J, Coban C, Kato H, *et al.* A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol*, 2006, **7**(1): 40-48
- [9] Stetson D B, Medzhitov R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity*, 2006, **24**(1): 93-103
- [10] Rebsamen M, Heinz L X, Meylan E, *et al.* DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF- κ B. *EMBO Rep*, 2009, **10**(8): 916-922
- [11] Muruve D A, Petrilli V, Zaiss A K, *et al.* The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*, 2008, **452**(7183): 103-107
- [12] Manzanillo P S, Shiloh M U, Portnoy D A, *et al.* Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe*, 2012, **11**(5): 469-480
- [13] Wenzel M, Wunderlich M, Besch R, *et al.* Cytosolic DNA triggers mitochondrial apoptosis via DNA damage signaling proteins independently of AIM2 and RNA polymerase III. *J Immunol*, 2012, **188**(1): 394-403
- [14] Civril F, Deimling T, de Oliveira Mann C C, *et al.* Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature*, 2013, **498**(7454): 332-337
- [15] Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, *et al.* cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature*, 2013, **498**(7454): 380-384
- [16] Diner E J, Vance R E. Taking the STING out of cytosolic DNA sensing. *Trends in Immunology*, 2013, S1471-4906(13)00167-1
- [17] Burdette D L, Vance R E. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol*, 2013, **14**(1): 19-26
- [18] Diner E J, Burdette D L, Wilson S C, *et al.* The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell Rep*, 2013, **3**(5): 1355-1361
- [19] Zhang X, Shi H, Wu J, *et al.* Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol Cell*, 2013, **51**(2): 226-235
- [20] Ishikawa H, Barber G N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, 2008, **455**(7213): 674-678
- [21] 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
- [22] 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
- [23] Abe T, Harashima A, Xia T, *et al.* STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol Cell*, 2013, **50**(1): 5-15
- [24] Ouyang S, Song X, Wang Y, *et al.* Structural analysis of the STING adaptor protein reveals a hydrophobic dimer interface and mode of cyclic di-GMP binding. *Immunity*, 2012, **36**(6): 1073-1086
- [25] Shang G, Zhu D, Li N, *et al.* Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**(7): 725-727
- [26] Yin Q, Tian Y, Kabaleeswaran V, *et al.* Cyclic di-GMP sensing via the innate immune signaling protein STING. *Mol Cell*, 2012, **46**(6): 735-745
- [27] Romling U, Galperin M Y, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, **77**(1): 1-52
- [28] Corrigan R M, Grundling A. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nat Rev Microbiol*, 2013, **11**(8): 513-524

- [29] Luo Y, Helmann J D. Analysis of the role of *Bacillus subtilis* sigma (M) in beta-lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. *Molecular Microbiology*, 2012, **83**(3): 623–639
- [30] Corrigan R M, Abbott J C, Burhenne H, *et al.* c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress. *PLoS Pathogens*, 2011, **7**(9): e1002217
- [31] Davies B W, Bogard R W, Young T S, *et al.* Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell*, 2012, **149**(2): 358–370
- [32] Wu J, Sun L, Chen X, *et al.* Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*, 2013, **339**(6121): 826–830
- [33] Sun L, Wu J, Du F, *et al.* Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, 2013, **339**(6121): 786–791
- [34] Li X, Shu C, Yi G, *et al.* Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. *Immunity*, 2013, **39**(6): 1019–1031
- [35] Gao P, Ascano M, Wu Y, *et al.* Cyclic [G(2', 5')pA(3', 5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase. *Cell*, 2013, **153**(5): 1094–1107
- [36] Kranzusch P J, Lee A S, Berger J M, *et al.* Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep*, 2013, **3**(5): 1362–1368
- [37] Donovan J, Dufner M, Korennykh A. Structural basis for cytosolic double-stranded RNA surveillance by human oligoadenylate synthetase 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(5): 1652–1657
- [38] Xiao T S, Fitzgerald K A. The cGAS-STING pathway for DNA sensing. *Mol Cell*, 2013, **51**(2): 135–139
- [39] Danilchanka O, Mekalanos J J. Cyclic dinucleotides and the innate immune response. *Cell*, 2013, **154**(5): 962–970
- [40] Atianand M K, Fitzgerald K A. Molecular basis of DNA recognition in the immune system. *J Immunol*, 2013, **190**(5): 1911–1918
- [41] Tanaka Y, Chen Z J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal*, 2012, **5**(214): ra20
- [42] Schoggins J W, Macduff D A, Imanaka N, *et al.* Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature*, 2014, **505**(7485): 691–695
- [43] Lam E, Stein S, Falck-Pedersen E. Adenovirus detection by the cGAS/STING/TBK1 DNA sensing cascade. *J Virol*, 2013, **88**(2): 974–981
- [44] Berg R K, Melchjorsen J, Rintahaka J, *et al.* Genomic HIV RNA induces innate immune responses through RIG-I-dependent sensing of secondary-structured RNA. *PloS One*, 2012, **7**(1): e29291
- [45] Hasan M, Koch J, Rakheja D, *et al.* Trex1 regulates lysosomal biogenesis and interferon-independent activation of antiviral genes. *Nat Immunol*, 2013, **14**(1): 61–71
- [46] Solis M, Nakhaei P, Jalalirad M, *et al.* RIG-I-mediated antiviral signaling is inhibited in HIV-1 infection by a protease-mediated sequestration of RIG-I. *J Virol*, 2011, **85**(3): 1224–1236
- [47] Yan N, Regalado-Magdos A D, Stiggelbout B, *et al.* The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat Immunol*, 2010, **11**(11): 1005–1013
- [48] Doitsh G, Cavois M, Lassen K G, *et al.* Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. *Cell*, 2010, **143**(5): 789–801
- [49] Gao D, Wu J, Wu Y T, *et al.* Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science*, 2013, **341**(6148): 903–906
- [50] Li X D, Wu J, Gao D, *et al.* Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science*, 2013, **341**(6152): 1390–1394
- [51] Barker J R, Koestler B J, Carpenter V K, *et al.* STING-dependent recognition of cyclic di-AMP mediates type I interferon responses during *Chlamydia trachomatis* infection. *mBio*, 2013, **4**(3): e00018–13
- [52] Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, *et al.* Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*, 2013, **57**(1): 46–58
- [53] Ding Q, Cao X, Lu J, *et al.* Hepatitis C virus NS4B blocks the interaction of STING and TBK1 to evade host innate immunity. *J Hepatol*, 2013, **59**(1): 52–58
- [54] Aguirre S, Maestre A M, Pagni S, *et al.* DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS pathogens*, 2012, **8**(10): e1002934
- [55] Kim S, Li L, Maliga Z, *et al.* Anticancer flavonoids are mouse-selective STING agonists. *ACS Chem Biol*, 2013, **8**(7): 1396–1401

cGAS-STING: The Novel Mechanism of Cytosolic DNA Sensing Pathways*

DING Liang¹⁾, NI Yan-Hong^{1,2)**}, HU Qin-Gang²⁾, HOU Ya-Yi¹⁾

¹⁾ Division of Immunology, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

²⁾ Institute and Hospital of Stomatology, Nanjing University Medical School, Nanjing Stomatology Hospital Central Laboratory, Nanjing 210093, China)

Abstract The dangerous signature came from unintegrated DNA or episome in cytoplasm could be detected by innate immunity, but how it works is unclear. Recently, more than 10 DNA sensors have been found to connect with the DNA sensing and immune defense. The cytosolic DNA induces the type I interferon and other cytokines depended on the stimulator of interferon genes, namely STING (also known as ERIS, MITA, MPYS, and TMEM173), which functions as a key adaptor protein in the DNA sensing pathways. Surprisingly, some investigators identified a novel nucleotidyl transferase, cGAS, which produces an endogenous second-messenger cGAMP to activate STING in the cytoplasm of mammalian cells. However, how DNA activates STING to induce protective immune responses against virus, protozoa and bacteria need to be explored further. In this review, we discuss the recent research progress regarding the DNA sensing by cGAS and the mechanisms involved in activation of STING and subsequently immune responses.

Key words stimulator of interferon genes (STING), nucleotidyl transferase, cyclic GMP-AMP synthase (cGAS), anti-infection immunity, DNA sensor

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00497

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(81072213, 81271698), National Clinical Key Subject Construction Project(2011), Jiangsu Provincial Clinical Medical Science and Technology Special(BL2012017), The Construction Project of Nanjing Key Laboratory of Medical(2012) and Nanjing City Medical Technology Development Project(YKK09124).

**Corresponding author.

Tel: 86-25-83620140, E-mail: niyanhong12@163.com

Received: December 10, 2013 Accepted: February 17, 2014