

• 动物及兽医生物技术 •

非洲猪瘟病毒 I226R 蛋白抑制 cGAS-STING 通路介导的天然免疫应答

李亚波^{1,2}, 娄慧聪^{1,2}, 赵雨娜^{1,2}, 范文辉², 焦鹏涛², 孙蕾^{2,3}, 罗廷荣¹, 刘文军^{1,2,3*}

1 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530000

2 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学, 北京 100049

李亚波, 娄慧聪, 赵雨娜, 范文辉, 焦鹏涛, 孙蕾, 罗廷荣, 刘文军. 非洲猪瘟病毒 I226R 蛋白抑制 cGAS-STING 通路介导的天然免疫应答[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4796-4808.

LI Yabo, LOU Huicong, ZHAO Yuna, FAN Wenhui, JIAO Pengtao, SUN Lei, LUO Tingrong, LIU Wenjun. The I226R protein of African swine fever virus inhibits the cGAS-STING-mediated innate immune response[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4796-4808.

摘要: 本研究旨在探究非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV) I226R 蛋白(I226R protein, pI226R)抑制 cGAS-STING 信号通路的作用机制。利用双荧光素酶报告系统和实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR)证明 pI226R 显著抑制 cGAS-STING 通路介导的 I 型干扰素及干扰素刺激相关基因的产生。免疫共沉淀及激光共聚焦显微镜试验发现 pI226R 与 cGAS 蛋白相互作用。免疫印迹分析证明 pI226R 通过自噬-溶酶体途径促进 cGAS 蛋白的降解。同时, pI226R 阻碍了 cGAS 与 E3 泛素连接酶三基序蛋白 56 (tripartite motif protein 56, TRIM56)的结合, 导致 cGAS 的单泛素化减弱, 从而抑制了 cGAS 的活化和 cGAS-STING 通路的激活。总之, 本研究证明 ASFV pI226R 通过拮抗 cGAS 进而抑制宿主的抗病毒天然免疫反应, 进一步增加了对研究 ASFV 免疫逃逸机制的理解, 为疫苗的研发提供了理论基础。

关键词: 非洲猪瘟病毒; I226R 蛋白; cGAS-STING 信号通路; 天然免疫应答

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1801202); 国家自然科学基金(31941015); 内蒙古自治区科技计划项目(2021ZD0010-04)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1801202), the National Natural Science Foundation of China (31941015), and the Science and Technology Program of Inner Mongolia Autonomous Region (2021ZD0010-04).

*Corresponding author. Tel: +86-10-64807503, E-mail: liuwj@im.ac.cn

Received: 2023-02-14; Accepted: 2023-05-31

The I226R protein of African swine fever virus inhibits the cGAS-STING-mediated innate immune response

LI Yabo^{1,2}, LOU Huicong^{1,2}, ZHAO Yuna^{1,2}, FAN Wenhui², JIAO Pengtao², SUN Lei^{2,3}, LUO Tingrong¹, LIU Wenjun^{1,2,3*}

1 Animal Science and Technology College, Guangxi University, Nanning 530000, Guangxi, China

2 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology,

Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: This study aimed to explore the mechanism of how African swine fever virus (ASFV) I226R protein inhibits the cGAS-STING signaling pathway. We observed that I226R protein (pI226R) significantly inhibited the cGAS-STING-mediated type I interferons and the interferon-stimulated genes production by dual-luciferase reporter assay system and real-time quantitative PCR. The results of co-immunoprecipitation assay and confocal microscopy showed that pI226R interacted with cGAS. Furthermore, pI226R promoted cGAS degradation through autophagy-lysosome pathway. Moreover, we found that pI226R decreased the binding of cGAS to E3 ligase tripartite motif protein 56 (TRIM56), resulting in the weakened monoubiquitination of cGAS, thus inhibiting the activation of cGAS and cGAS-STING signaling. In conclusion, ASFV pI226R suppresses the antiviral innate immune response by antagonizing cGAS, which contributes to an in-depth understanding of the immune escape mechanism of ASFV and provides a theoretical basis for the development of vaccines.

Keywords: African swine fever virus; I226R protein; cGAS-STING signaling pathway; innate immune response

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒科、非洲猪瘟病毒属的唯一成员——非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的一种高传染性、高死亡率的动物疾病^[1]。ASFV 是一种具有正二十面体结构的多层 DNA 病毒,病毒粒子结构从内到外依次是:核酸 DNA 层(nucliod)、核衣壳层(core shell)、内膜双分子磷质层(inner capsule membrane)、衣壳层(capsid)和囊膜层(outer membrane)^[2]。ASFV 的基因组长度大约是 170–190 kb,含有 150–167 个开放阅读框,编码 200 多种蛋白质,其编码的蛋白大多数功能未知,病毒培养、感染实验需在高级别生物安全实验室开展,目前尚无批准上市的非洲猪瘟

商品化疫苗^[2]。

ASFV 编码多种蛋白参与宿主细胞免疫逃逸,如:pF317L 与 I κ B 激酶 β (I κ B kinase β , IKK β) 相互作用并抑制其磷酸化,抑制核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)活化^[3]。pE120R 可以与干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factors 3, IRF3) CTD 相互作用,破坏 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1)与 IRF3 之间的相互作用并阻断其磷酸化,进而抑制干扰素 β (interferon- β , IFN- β)的激活^[4]。pI215L 通过降解干扰素调节因子 9 (interferon regulatory factors 9, IRF9)来抑制 I 型干扰素信号传导^[5],还可以招募环指蛋白 138 (ring finger protein138,

RNF138)抑制 TBK1 的 K63 泛素化,从而负向调节 cGAS-STING 信号通路^[6]。pD345L 通过抑制 IKK 激酶活性而负调节 NF- κ B 信号通路^[7]。pDP96R 与 TBK1 相互作用并抑制了 TBK1 以及 IRF3 的磷酸化^[8]。pA528R 通过靶向 p65, 激活 p65 核易位来抑制 Toll 样受体 8 (Toll-like receptors, TLR8)介导的 NF- κ B 信号传导等^[9]。

病毒、细菌和真菌等病原体在感染宿主后,其 DNA 或 RNA 片段作为一种病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)暴露于细胞质很容易被细胞内的模式识别受体,如:环磷酸鸟苷-磷酸腺苷合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)、视黄酸诱导基因蛋白 I (retinoic acid induced gene I, RIG-I)、干扰素 γ 诱导蛋白 16 (interferon-inducible protein 16, IFI16)、解旋酶 41 (dead-box helicase 41, DDX41)和 DNA 依赖性干扰素调节因子激活剂(DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors, DAI)等识别^[10-13]。其中 cGAS 与病毒的 DNA 结合后,将三磷酸腺苷(adenosine 5'-triphosphate, ATP)和三磷酸鸟苷(guanosine-5'-triphosphate, GTP)转化为第二信使环状 GMP-AMP (cyclic GMP-AMP, cGAMP),在这个过程中,E3 连接酶 TRIM56 与 cGAS 相互作用,这种相互作用促进 cGAS 的 Lys335 单泛素化,导致 DNA 结合活性和 cGAMP 的产生均显著增加^[14-15],cGAMP 结合并激活干扰素基因刺激蛋白(stimulator of interferon genes, STING)并导致 STING 构象发生变化,进而从内质网转移至高尔基体,招募 TBK1 和 IRF3 并促进其磷酸化进而触发 I 型干扰素的产生^[16-17]。

天然免疫系统作为机体的第一道防线,也是病毒复制和传播过程中免疫抑制的关键靶点,因此研究病毒的免疫逃逸机制具有重要意义。*I226R* 基因是 ASFV 的一个重要毒力基因,在不同的毒株中其同源性达 90%以上,这表明 *I226R*

基因可能与病毒毒力和复制有关^[18],但 *I226R* 蛋白(pI226R)抑制 cGAS-STING 通路的具体机制还未见报道。本研究旨在探究 ASFV pI226R 调控 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素分泌的分子机制,拓展 ASFV 的免疫逃逸机制,以期疫苗的研发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pIFN- β -Luc、pRL-TK-luc、pFlag-cGAS、pMyc-STING、pMyc-TBK1、pFlag-IRF3 和 pHA-I226R 表达质粒以及人胚胎肾细胞(Human embryonic kidney cells, HEK293T)和猪肾细胞(PK-15)由本实验室保存;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及细胞培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购自 Gibco 公司;兔抗 TBK1/NAK、phospho-TBK1/NAK (Ser172)、IRF3、phospho-IRF-3 (Ser396)、cGAS (E9G9G)以及小鼠抗 HA、Flag、Myc、Tubulin 和 GAPDH 单克隆抗体、Alexa Fluor 488 和 Alexa Fluor 633 抗体均购自 Cell Signaling Technology (CST);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗鼠和山羊抗兔 IgG 二抗均购自 Proteintech 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega)购自 Sigma 公司;质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;TRIzol 试剂购自赛默飞世尔科技公司;反转录试剂盒(PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)、荧光定试剂盒(2 \times SYBR Green PCR Master Mix)以及聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)均购自宝生物工程(大连)有限公司;Western blotting 成像系统购自 Bio-Rad 公司;7500 Real-time PCR 仪购自 ABI 公司。

1.2 双荧光素酶报告系统试验

将 PK-15 细胞用 0.05%胰酶消化后加入适量

含 10%FBS 的培养基吹打混匀后,将细胞接种于 24 孔板内,待细胞汇合度达到 60%–80%左右,瞬时转染 pFlag-cGAS (100 ng)、pMyc-STING (100 ng)、pRL-TK-luc (20 ng)、pIFN- β -Luc (100 ng) 和 pHA-I226R (0、100、200、300 ng)或空载体质粒至 PK-15 细胞中,转染 24 h 后用细胞裂解液收集细胞,检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性。

将 PK-15 细胞用 0.05%胰酶消化后加入适量含 10% FBS 的培养基吹打混匀后,将细胞接种于 24 孔板内,待细胞汇合度达到 60%–80%左右,瞬时转染 pRL-TK-luc (20 ng)、pIFN- β -Luc (100 ng)和 pHA-I226R (0、100、200、300 ng)或空载体共转染至 PK-15 细胞中,18 h 后转染 poly (dA:dT) (2 μ g),12 h 后收集样品检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性。

1.3 免疫印迹分析

将 pFlag-cGAS (100 ng)、pHA-STING (100 ng)、pHA-I226R (0、100、200、300 ng)或空载体质粒转染至 PK-15 细胞(12 孔板),24 h 后弃去上清,加入细胞裂解液收集细胞,置于 4 $^{\circ}$ C 旋转裂解 30 min 以上。98 $^{\circ}$ C 金属浴加热 10 min,之后 12 000 r/min 离心 10 min。将处理后的样品进行 SDS-PAGE,转印至 PVDF 膜后,脱脂乳封闭 60 min,分别以 1:2 000 的比例用新鲜配制的封闭液稀释抗 HA、抗 Flag 或抗 Tubulin 单抗,孵育 PVDF 膜 4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜液洗涤 3 次,每次 10 min,孵育 HRP 标记的抗鼠二抗 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,利用 Western blotting 成像系统检测蛋白表达情况。

将 pFlag-cGAS (1 μ g)、pMyc-STING (1 μ g)、pHA-I226R (1.5 μ g)或空载体质粒转染至 HEK293T 细胞(6 孔板),24 h 后收集并处理细胞样品进行 SDS-PAGE。转印至 PVDF 膜后进行免疫印迹分析,利用 Western blotting 成像系统检测蛋白表达。

将 pFlag-cGAS (1 μ g)、pHA-I226R (1.5 μ g)或空载体质粒转染至 HEK293T 细胞(12 孔板)24 h 后,按照 1:1 000 加入放线菌酮(cycloheximide, CHX),分别处理 0、3、6、9 h,收集并处理细胞样品进行 SDS-PAGE。转印至 PVDF 膜后进行免疫印迹分析,利用 Western blotting 成像系统检测蛋白表达。

将 pFlag-cGAS (1 μ g)、pHA-I226R (1.5 μ g)或空载体质粒转染至 HEK293T 细胞(12 孔板)24 h 后,按照 1:1 000 加入放线菌酮(CHX)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide DMSO)、MG132 或 NH₄Cl 处理 8 h,收集并处理细胞样品进行 SDS-PAGE。转印至 PVDF 膜后进行免疫印迹分析,利用 Western blotting 成像系统检测蛋白表达。

1.4 免疫共沉淀试验

使用 0.05%胰酶消化 HEK293T 细胞后,加入适量培养基充分混匀,转移至直径为 10 cm 培养皿中培养,待单层细胞融合度在 80%左右时,将 HA-I226R (4 μ g)分别与 pFlag-cGAS (3 μ g)、pMyc-STING (3 μ g)、pMyc-TBK1 (6 μ g)或相应空载体共转染至 HEK293T 细胞中;24 h 后弃去上层培养基,加入 1 mL 细胞裂解液收集细胞。4 $^{\circ}$ C 旋转摇床裂解 30 min 以上,12 000 r/min 离心 10 min。吸取 80 μ L 上清作 WCL 组,加 20 μ L 5 \times 上样缓冲液,置于 98 $^{\circ}$ C 金属浴中加热 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,置于-20 $^{\circ}$ C 备用;剩余上清用作 IP 检测。将 Beads 混匀,使用平口枪头吸取,用裂解缓冲液(lysis buffer)清洗磁珠;样品中加入 20 μ L Anti-Flag-Beads 或 Anti-Myc-Beads,4 $^{\circ}$ C 混匀旋转仪混合过夜;从混匀旋转仪取出,用 300 mmol/L 裂解缓冲液和 150 mmol/L 裂解缓冲液洗涤 5–7 次,每次 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 2 min,吸去上清,注意不要吸到 beads;最后一次离心后,将残留的液体尽量吸干净,加入 20 μ L 的 150 mmol/L 裂解缓冲液和 5 μ L 的 5 \times 上样缓冲液,98 $^{\circ}$ C

煮样 15 min, 离心后取上清上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

1.5 相对定量 PCR

将 pHA-I226R (3 μ g) 或空载体转染至 PK-15 细胞中(12 孔板)培养 18 h, 之后转染 poly (dA:dT) (2 μ g) 再培养 12 h, 弃去上层液体, 用 TRIzol 收集细胞提取总 RNA, 反转录为 cDNA 后, 进行相对定量 PCR 检测。

将 pFlag-cGAS (1 μ g)、pMyc-STING (1 μ g) 和 pHA-I226R (2 μ g) 或空载体共转染至 PK-15 细胞(6 孔板)培养 24 h, 弃去上层液体, 用 TRIzol 收集细胞提取总 RNA, 反转录为 cDNA 后, 进行相对定量 PCR 检测。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 共 40 个循环。相对定量引物序列如表 1 所示(引物由北京擎科生物科技有限公司合成), 应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算组间 mRNA 的转录水平的差异倍数, 所有数据均以独立重复 3 次的 $\pm s$ 表示, 两组之间的比较采用双尾学生 *t*-test 检验(unpaired, two-tailed Student's *t* test)分析。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

1.6 荧光共聚焦试验

提前 1 d 将 HEK293T 细胞消化后转移至放好盖玻片的 24 孔板中培养, 将 pHA-I226R (500 ng) 质粒和 Flag-cGAS 质粒(500 ng) 共转染至 HEK293T 细胞中, 置于细胞培养箱中培养 18 h 后, 弃上清, 用 PBS 清洗 1 次; 4% 多聚甲醛固定 45 min; 用 0.05% Triton X-100 处理 15 min; 用 5% 牛血清白蛋白(bovine serum

albumin, BSA) 封闭 30 min; 用 Flag 标签抗体 (1:200) 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 再用抗鼠的 TRITC 二抗 (1:800) 进行染色, 室温作用 1 h, 加入 PBST 洗 3 次; 用 HA 标签抗体(1:200) 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 再用抗兔 FITC 的二抗(1:800) 进行染色, 室温作用 1 h, 加入 PBST 洗 3 次; 最后用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色 10 min, 随后用 PBST 洗 3 次, 封片后置于共聚焦显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 pI226R 抑制 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素的激活

在 PK-15 细胞中转染 pIFN- β -Luc、pRL-TK-luc、pFlag-cGAS、pMyc-STING 质粒以及不同剂量的 pHA-I226R 质粒(0、100、200、300 ng), 发现 pI226R 能显著抑制 cGAS-STING 诱导的 IFN- β 启动子的荧光素酶活性, 并呈现剂量依赖的作用(图 1A)。在 PK-15 细胞中转染 pIFN- β -Luc、pRL-TK-luc 质粒以及不同剂量的 pHA-I226R 表达质粒, 18 h 后转染 poly (dA:dT) (1 μ g/mL) 刺激 12 h, 发现 pI226R 抑制 poly (dA:dT) 诱导的 IFN- β 启动子的荧光素酶活性, 并呈现剂量依赖的作用(图 1B)。在 PK-15 细胞中转染 pFlag-cGAS、pMyc-STING 以及 pHA-I226R 或空载体, 24 h 后用 TRIzol 提取细胞 RNA, 通过荧光定量 PCR 检测 *IFNA*、*IFNB*、*ISG15*、*ISG54* 和 *ISG56* 的 mRNA 水平; 在 PK-15 细胞中转染

表 1 RT-qPCR 所用引物

Table 1 Primers for RT-qPCR

Gene names	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
<i>β-actin</i>	GGACTTCGAGCAGGAGATGG	GGATTCCATGCCAGGAAGG
<i>IFNA</i>	CTGCTGCCTGGAATGAGAGCC	TGACACAGGCTTCCAGGTCCC
<i>IFNB</i>	TTCGAGGTCCCTGAGGAGAT	ACGGTTTCATTCCAGCCAGT
<i>ISG15</i>	CCCTTGAGGGACTGCATGAT	GACCCTTGTCGTTCTCACC
<i>ISG54</i>	GCACAGCAATCATGAGTGAGAC	GCTTGCCGTAAGCATTCAG
<i>ISG56</i>	TCAGAGGTGAGAAGGCTGGT	GCTTCCTGCAAGTGTCTTC

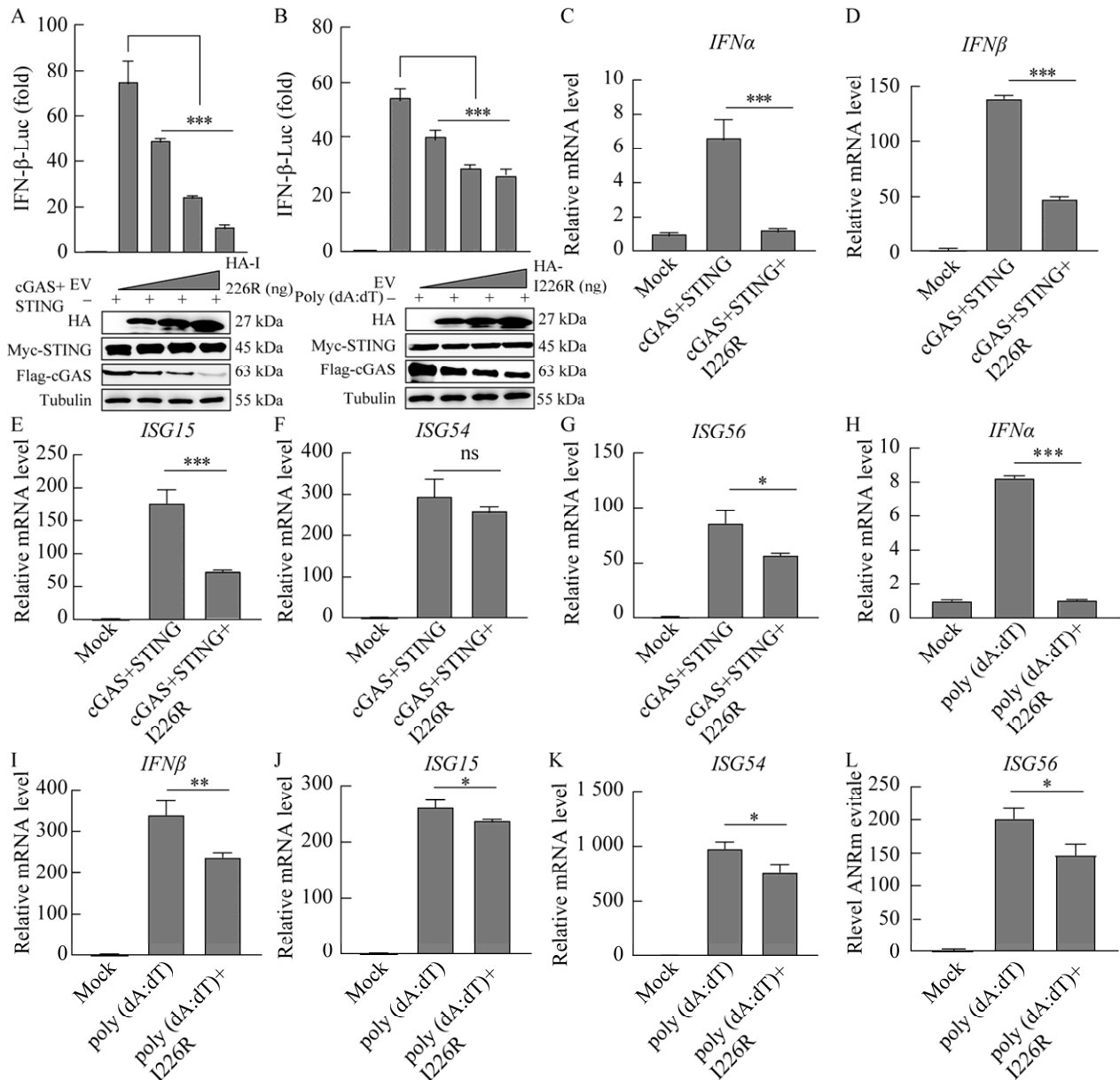


图 1 pi226R 抑制 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素

Figure 1 pi226R inhibits the cGAS-STING mediated type I interferon. A: pi226R inhibits cGAS-STING mediated IFN- β in a dose-dependent manner. PK-15 cells were transfected with pIFN- β -Luc, pRL-TK-luc, pFlag-cGAS, pMyc-STING and increased amounts of pHA-I226R for 24 h followed by luciferase assay (top). Immunoblot analysis of I226R, STING, cGAS, and tubulin was shown in the bottom. B: pi226R inhibits poly (dA:dT) mediated IFN- β in a dose-dependent manner. PK-15 cells were transfected with pIFN- β -Luc, pRL-TK-luc, and increased amounts of pHA-I226R for 18 h, and then transfected with poly (dA:dT) followed by luciferase assays. Immunoblot analysis of I226R, STING, cGAS, and tubulin was shown in the bottom. C–G: pi226R inhibits cGAS-STING-induced transcription of antiviral genes in PK-15 cells. PK-15 cells were transfected for 24 h. Then the TRIzol extracted cellular RNA was used to detect the mRNA levels of *IFNA*, *IFNB*, *ISG15*, *ISG54*, *ISG56* by real-time PCR. H–L: pi226R inhibits poly (dA:dT)-induced transcription of antiviral genes in PK-15 cells. PK-15 cells were transfected with pHA-I226R for 24 h and poly (dA:dT) for 12 h, followed by detecting the mRNA levels using real-time PCR. EV: Empty vector; Mock: Blank control; All experiments were performed in triplicate; ns: No significance; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

pHA-I226R 或空载体, 18 h 后转染 poly (dA:dT) 刺激 12 h 后, 用 TRIzol 提取细胞 RNA, 通过荧光定量 PCR 检测 *IFNA*、*IFNB*、*ISG15*、*ISG54* 和 *ISG56* 的 mRNA 水平。结果表明, pI226R 能显著抑制 cGAS-STING(图 1C-G)和 poly (dA:dT) (图 1H-L)诱导的 I 型干扰素的激活。以上结果表明, pI226R 能够显著抑制 cGAS-STING 介导的 I 型干扰素信号通路。

2.2 I226R 抑制 TBK1 和 IRF3 的磷酸化

为了进一步证实 I226R 对 cGAS-STING 信号通路的抑制作用, 我们检测了通路下游 TBK1 和 IRF3 的磷酸化水平。在 HEK293T 细胞中共转染 Flag-cGAS、Myc-STING 和 HA-I226R 或相应空载体的表达质粒, 分别在转染后 12、24、36、48 h 收集细胞样品, 用免疫印迹的方法检测 TBK1 和 IRF3 蛋白的磷酸化水平。如图 2A 所示, 过表达 cGAS 和 STING 可以提高 TBK1 和 IRF3 的磷酸化水平, 而 I226R 对这种磷酸化水平显示了明显的抑制作用(图 2B、2C)。以上结果说明,

I226R 可以抑制 cGAS-STING 介导的 TBK1 和 IRF3 磷酸化。

2.3 cGAS 是 I226R 抑制 cGAS-STING 通路激活的靶蛋白

为了探究 I226R 调控 cGAS-STING 信号通路的潜在靶点, 在 HEK293T 细胞中转染 pIFN- β -Luc、pRL-TK-luc 和 pHA-I226R 质粒 18 h 后, 分别转染 cGAS、STING、TBK1、IRF3 表达质粒, 24 h 后检测 IFN- β 启动子的荧光素酶活性。结果表明, I226R 的过表达显著抑制了 cGAS 激活的 IFN- β 启动子的活化(图 3A), 而对 STING、TBK1 和 IRF3 诱导的 IFN- β 启动子的活化并无抑制作用(图 3B-3D), 初步说明 I226R 的靶点并不是 STING、TBK1 和 IRF3。为了进一步探索其潜在靶点, 将 pHA-I226R 分别与 pFlag-cGAS、pMyc-STING、pMyc-TBK1 和 pFlag-IRF3 共转染至 HEK293T 细胞, 24 h 后用细胞裂解液收取细胞样品, 免疫共沉淀试验显示, I226R 与 cGAS 存在相互作用(图 3E-3H)。与此同时, 将 pHA-I226R

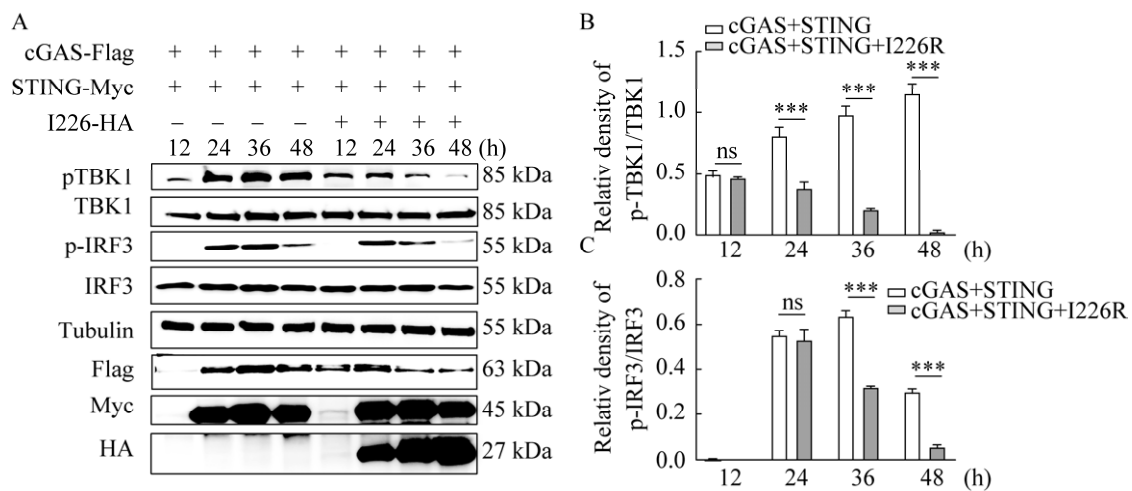


图 2 I226R 抑制 TBK1 和 IRF3 的磷酸化水平

Figure 2 I226R inhibits phosphorylation levels of TBK1 and IRF3. A: I226R inhibits TBK1 and IRF3 phosphorylation. HEK293T cells were transfected with pFlag-cGAS, pMyc-STING, and pHA-I226R or empty vector, and samples were collected to detect phosphorylation. B, C: The ratio of p-TBK1/TBK1 and p-IRF3/IRF3 in HEK293T cells was performed in triplicate. ns: No significance; ***: $P < 0.001$.

和 pFlag-cGAS 共转染至 HEK293T 细胞, 用激光共聚焦显微镜观察共定位情况。结果显示, I226R 与 cGAS 存在共定位现象(图 3I)。除此之外, 在 PK-15 细胞中过表达 I226R 或相对应的

空载体, 收集细胞样品, 利用 HA-Beads 通过免疫共沉淀的方法检测到内源性的 cGAS 条带(图 3J)。由此可见, I226R 通过与 cGAS 相互作用抑制 cGAS-STING 通路的激活。

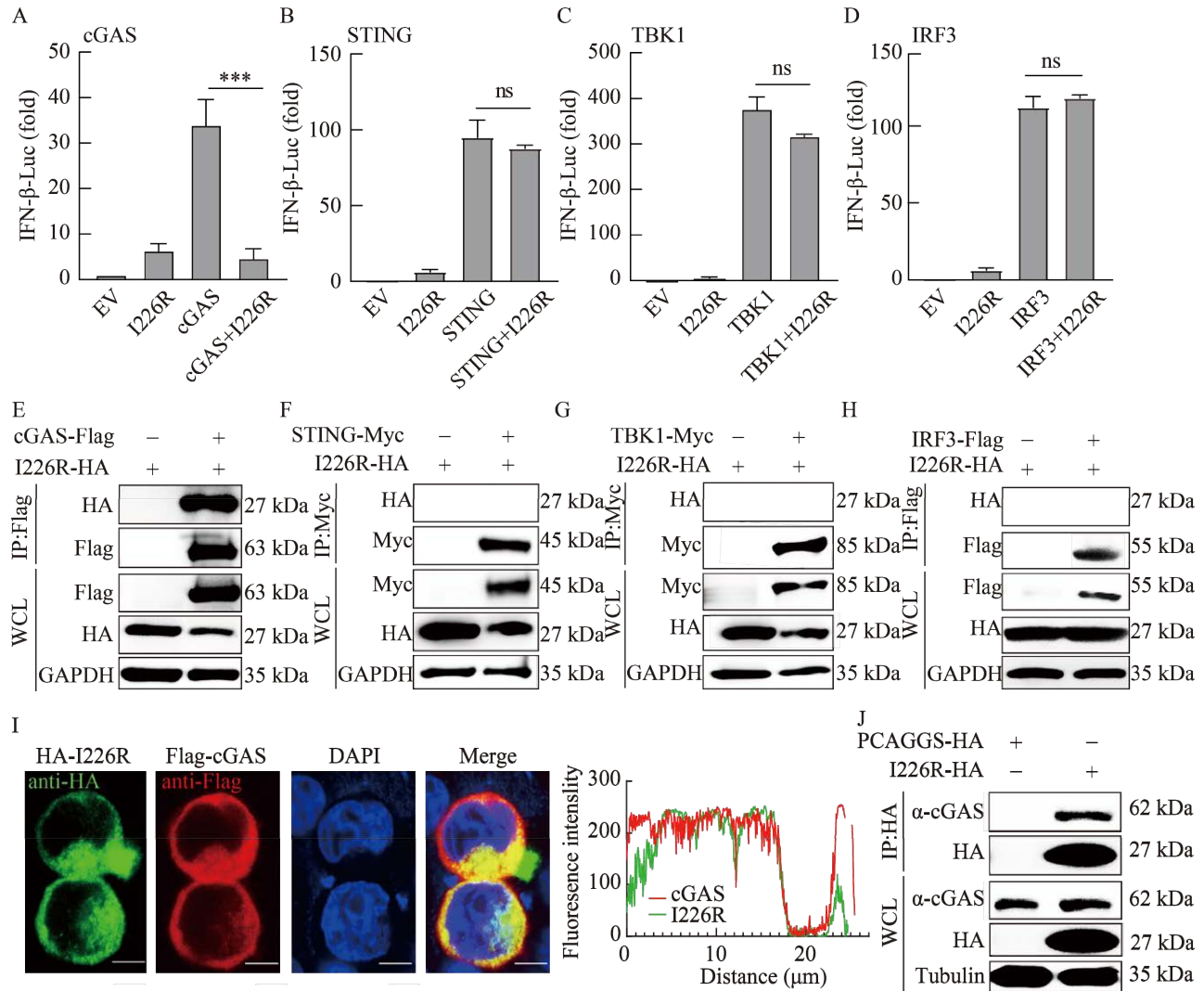


图 3 cGAS 是 I226R 抑制 cGAS-STING 通路的潜在靶点

Figure 3 cGAS was the potential target for I226R to suppress cGAS-STING pathway. A–D: HEK293T cells were transfected with pIFN- β -Luc, pRL-TK-luc, pHA-I226R, or empty vector, along with pFlag-cGAS, pMyc-STING, or pMyc-TBK1 for 24 h followed by luciferase assays. Triplicate experiments were conducted. ns: No significance; ***: $P < 0.001$. E–H: I226R interacts with cGAS. HEK293T cells were transfected with pHA-I226R and pFlag-cGAS, along with pMyc-STING, pMyc-TBK1, or pFlag-IRF3 for 24 h, the lysates were immunoprecipitated with anti-Flag antibody or anti-Myc agarose beads. I: Colocalization I226R with cGAS. HEK293T cells were transfected with pFlag-cGAS and pHA-I226R for 18 h followed by confocal microscopy. Bar=5 μ m. J: I226R interacts with endogenous cGAS. PK15 cells were transfected with pHA-I226R and pPCAGGS-HA (empty vector) for 24 h, and the lysates were immunoprecipitated with anti-HA agarose beads.

2.4 pI226R 通过自噬-溶酶体途径降解 cGAS

为了探究 pI226R 是否影响 cGAS 的稳定性, 在 HEK293T 细胞中共转染 pFlag-cGAS 和 pHA-I226R, 24 h 后加入放线菌酮(CHX)分别对

其处理 0、3、6、9 h 后, 免疫印迹检测 cGAS 的表达, 结果显示 pI226R 影响了 cGAS 蛋白稳定性, 并对其具有降解作用(图 4A)。细胞内蛋白的降解主要依赖于泛素-蛋白酶体途径和自噬

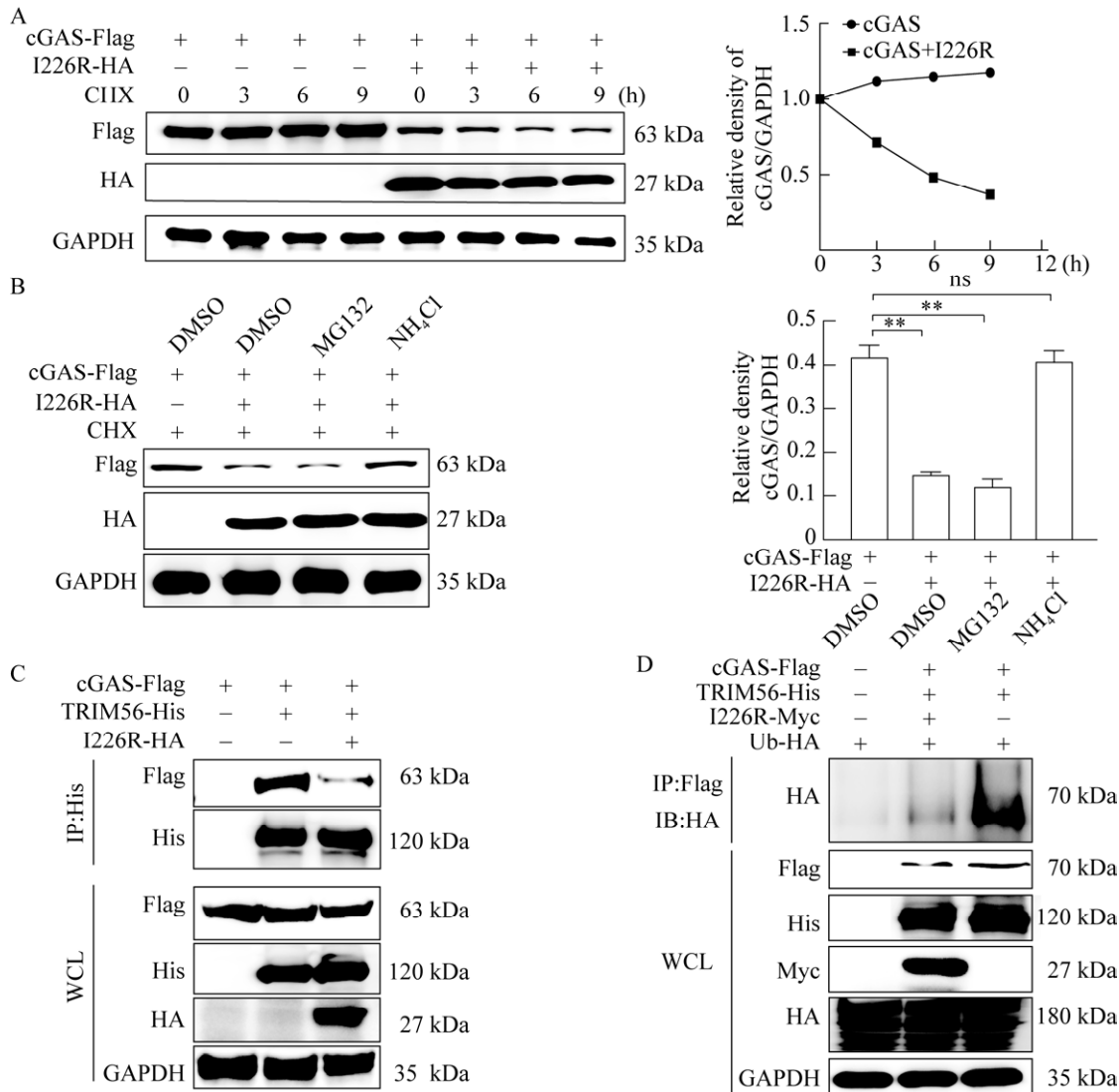


图 4 pI226R 通过自噬-溶酶体途径降解 cGAS 并抑制 cGAS 的单泛素化

Figure 4 pI226R degrades cGAS via the autophagy-lysosomal pathway and inhibits the monoubiquitination of cGAS. A: pI226R degrades cGAS. HEK293T cells were transfected with pFlag-cGAS, pHA-I226R, or empty vector for 24 h, and treated with CHX. The changes in the abundance of cGAS were normalized to GAPDH. B: pI226R degrades cGAS via the autophagy-lysosomal pathway. HEK293T cells were transfected with pFlag-cGAS and pHA-I226R, or empty vector for 24 h, then treated with DMSO (negative control), MG132 (20 μ mol/L), or NH₄Cl (100 mmol/L), respectively for 8 h. The changes in the abundance of cGAS were normalized to GAPDH. C: pI226R blocks the interaction between TRIM56 and cGAS. HEK293T cells were transfected with pFlag-cGAS, pHis-TRIM56, and pHA-I226R for 24 h and then co-immunoprecipitated with the antibody. D: pI226R inhibits TRIM56-mediated monoubiquitination of cGAS. HEK293T cells were transfected with pFlag-cGAS, pHis-TRIM56, pHA-Ub, and pHA-I226R for 24 h and then co-immunoprecipitated and Western blotting analyzed with the antibody. ns: No significance; **: $P < 0.01$.

体-溶酶体途径,因此进一步研究了 pI226R 对 cGAS 的降解途径。HEK293T 细胞中共转染 pHA-I226R 和 pFlag-cGAS,转染 24 h 分别用 DMSO、蛋白酶体途径抑制剂(MG132)、自噬途径抑制剂氯化铵(NH₄Cl)处理细胞 8 h,结果显示氯化铵(NH₄Cl)处理组抑制了 pI226R 对 cGAS 的降解,表明 pI226R 通过自噬-溶酶体途径降解 cGAS (图 4B)。

2.5 pI226R 通过影响 cGAS 的单泛素化抑制其活化

TRIM56 作为 cGAS 的 E3 连接酶,能够诱导其单泛素化,对 cGAS 的激活具有重要意义^[15]。因此,进一步检测 pI226R 是否影响了 cGAS 与 TRIM56 之间的相互作用从而影响 cGAS 的泛素化。在 HEK293T 细胞中共转染 pHis-TRIM56、pFlag-cGAS 和 pHA-I226R,24 h 后用细胞裂解液收集样品并进行免疫共沉淀实验,结果显示 pI226R 的过表达抑制了 TRIM56 与 cGAS 的相互作用(图 4C),这提示 pI226R 可阻断 TRIM56 与 cGAS 的相互作用。进一步研究了 pI226R 对 TRIM56 介导的 cGAS 泛素化影响,结果显示 pI226R 的过表达抑制了 TRIM56 介导的 cGAS 的单泛素化(图 4D)。以上结果表明,pI226R 可能通过阻断 cGAS 与 TRIM56 的相互作用减弱 TRIM56 介导的 cGAS 的单泛素化,从而抑制 cGAS 的活化。

3 讨论与结论

先天免疫系统是宿主抵抗病毒、细菌等病原相关分子模式的第一道防线^[19]。cGAS-STING 通路启动 I 型 IFN 信号传导和 NF- κ B 信号传导,在抵御 DNA 病毒感染中发挥重要作用。ASFV 进化出一系列的免疫逃逸策略来逃避宿主 I 型干扰素反应以促进病毒复制。目前已报道 ASFV 多基因家族的众多蛋白具有免疫逃逸的功能。例如:

pMGF505-7R 通过自噬-溶酶体途径靶向降解 STING 而负向调节 cGAS-STING 信号通路^[20]; pMGF505-7R 还能够上调环指蛋白 125 (ring finger protein125, RNF125)的表达促进 Janus 激酶 1 (janus kinase 1, JAK1)和 Janus 激酶 2 (janus kinase 2, JAK2)的降解^[21]; MGF360-12L 可以竞争性地与核转运蛋白 α 2 (karyopherin α 2, KPNA2)、核转运蛋白 α 3 (karyopherin α 3, KPNA3)和核转运蛋白 α 4 (karyopherin α 4, KPNA4)相互作用,中断了 p65 与 KPNA2, KPNA3 和 KPNA4 之间的结合,从而抑制 NF- κ B 核转位^[22]。pMGF360-14L 能够促进 E3 连接酶 TRIM21 介导的 IRF3 的 K63 多泛素化,与 IRF3 相互作用并破坏其稳定性^[23]。pMGF505-11R 与 STING 相互作用,通过泛素-蛋白酶体和自噬-溶酶体两种途径降解 STING,从而负向调节 cGAS-STING 信号通路^[24]。pMGF360-15R/pA276R 通过靶向 IRF3 来抑制通过 Toll 样受体 3 (Toll-like receptors, TLR3)和胞质途径的 IFN- β 诱导^[25]。以上研究为 ASF 疫苗设计提供了重要的理论依据。

目前 ASF 的防控还停留在扑杀和阻断传播途径的阶段,研发安全有效的疫苗对当前非洲猪瘟疫情防控十分必要。非洲猪瘟的灭活疫苗不能有效诱导细胞毒性 CD8⁺ T 细胞反应,不能对 ASFV 感染产生保护^[26-27];亚单位疫苗利用纯化的重组蛋白或合成的多肽,配合佐剂诱导保护性免疫反应,现有报道亚单位疫苗和 DNA 疫苗均仍不能对 ASFV 感染产生安全有效的保护^[27-29]。靶向删除 ASFV 免疫抑制基因构建的基因缺失减毒疫苗是短期内具有前景的非洲猪瘟疫苗研发技术策略。I226R 基因位于 ASFV 基因组的 3' 末端,转录曲线类似于 ASFV 的 B646L 蛋白,缺失 I226R 基因后的 SY18 株与亲本相比毒力明显减弱^[18]。被免疫猪群能够抵御 SY18 亲本的攻击,这提示缺失 I226R 基因的毒株可能激活了更高水平的天然免疫而免受 SY18 毒株的攻击^[18]。

但对于 *I226R* 基因缺失株的安全性、稳定性以及免疫效力还需要开展更多的研究工作。

研究表明, pI226R 通过自噬-溶酶体途径靶向 cGAS 蛋白并对其进行降解, 抑制 cGAS-STING 诱导的 I 型干扰素。另有研究表明, pI226R 的过表达抑制 NF- κ B 和 IRF3 的激活, 导致了 NEMO 的泛素化降解^[30]。这表明 pI226R 可能是一种多功能的蛋白, 通过不同的机制拮抗宿主的天然免疫反应。本研究对 pI226R 影响

cGAS-STING 信号通路的机制进行了探讨。试验结果表明, ASFV 非结构蛋白 pI226R 通过靶向 cGAS 抑制 cGAS-STING 通路逃避宿主天然免疫; pI226R 能够通过自噬-溶酶体途径降解 cGAS; 同时 pI226R 的过表达可阻断 cGAS 与 E3 连接酶 TRIM56 的结合, 抑制 TRIM56 介导的 cGAS 单泛素化, 从而减弱 cGAS-STING 通路的信号传导(图 5)。此外, 有研究表明敲除 TRIM56 导致单纯疱疹病毒 1 型(herpes simplex

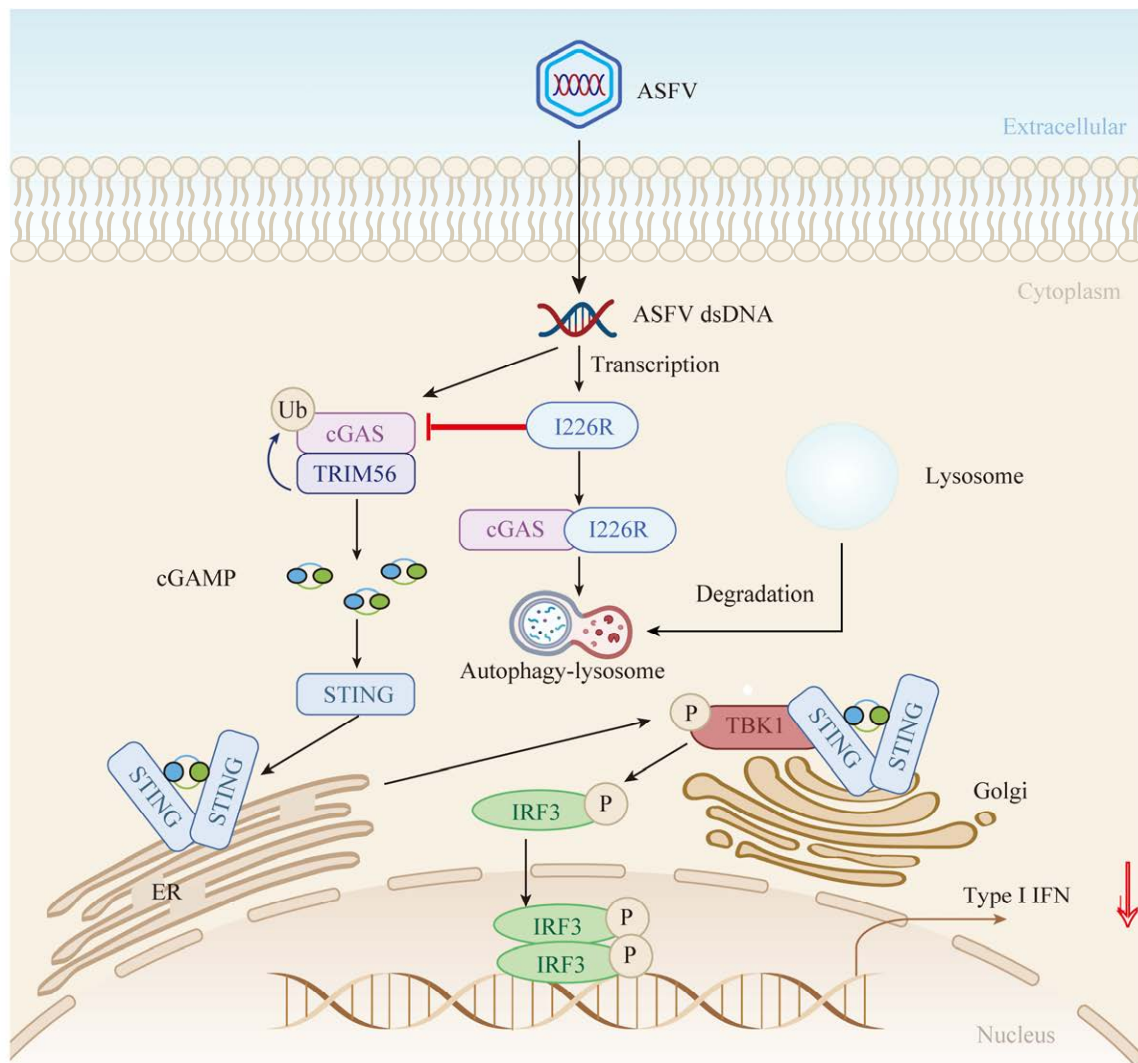


图 5 pI226R 抑制 cGAS-STING 信号通路

Figure 5 pI226R down-regulates the cGAS-STING signaling pathway. Upon ASFV infection, pI226R interacts with cGAS and triggers cGAS degradation via the autophagy-lysosomal pathway. Meanwhile, pI226R decreases the activation of cGAS by reducing the binding of cGAS to TRIM56.

virus type 1, HSV-1)激活的 cGAS-STING 通路介导的 IFN α / β 产生受到显著的抑制,提示 TRIM56 在抗病毒免疫反应中发挥重要作用^[15]。TRIM56 包含 4 个结构域,其中位于 C 端的 NHL 同源区域(307–755 aa)已被证明是与 cGAS 的 N 末端调控结构域 RD (1–160 aa)相互作用的关键区域^[15]。本研究证实了 pI226R 与 cGAS 相互作用,同时确定了 pI226R 能够减弱 TRIM56 与 cGAS 之间的相互作用。然而 pI226R 与 cGAS 互作的结构域尚不清楚,推测可能与 cGAS 的 N 端 RD 结构域有关,但有待进一步研究。本研究拓展了 pI226R 的生物学功能,揭示了 pI226R 拮抗宿主天然免疫应答的新机制,为 I226R 单基因或多基因缺失减毒疫苗的研究提供了重要的理论依据。

REFERENCES

- [1] 李飞, 徐雷, 朱玲. 非洲猪瘟疫苗研究进展[J]. 病毒学报, 2019, 35(4): 701-707.
LI F, XU L, ZHU L. Research progress of African swine fever vaccine[J]. Chinese Journal of Virology, 2019, 35(4): 701-707 (in Chinese).
- [2] WANG N, ZHAO DM, WANG JL, ZHANG YL, WANG M, GAO Y, LI F, WANG JF, BU ZG, RAO ZH, WANG XX. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. Science, 2019, 366(6465): 640-644.
- [3] YANG JP, LI SS, FENG T, ZHANG XL, YANG F, CAO WJ, CHEN HJ, LIU HS, ZHANG KS, ZHU ZX, ZHENG HX. African swine fever virus F317L protein inhibits NF- κ B activation to evade host immune response and promote viral replication[J]. mSphere, 2021, 6(5): 1-16.
- [4] LIU HS, ZHU ZX, FENG T, MA Z, XUE Q, WU PX, LI P, LI SS, YANG F, CAO WJ, XUE ZN, CHEN HJ, LIU XT, ZHENG HX. African swine fever virus E120R protein inhibits interferon beta production by interacting with IRF₃ to block its activation[J]. Journal of Virology, 2021, 95(18): 1-17.
- [5] LI L, FU JY, LI JX, GUO SB, CHEN QC, ZHANG YB, LIU ZK, TAN C, CHEN HC, WANG XR. African swine fever virus pI215L inhibits type I interferon signaling by targeting interferon regulatory factor 9 for autophagic degradation[J]. Journal of Virology, 2022, 96(17): 1-16.
- [6] HUANG L, XU WJ, LIU HY, XUE MD, LIU XH, ZHANG KL, HU L, LI JN, LIU XM, XIANG ZD, ZHENG J, LI CY, CHEN WY, BU ZG, XIONG T, WENG CJ. African swine fever virus pI215L negatively regulates cGAS-STING signaling pathway through recruiting RNF138 to inhibit K63-linked ubiquitination of TBK1[J]. The Journal of Immunology, 2021, 207(11): 2754-2769.
- [7] CHEN H, WANG ZZ, GAO XY, LV JX, HU YX, JUNG YS, ZHU SY, WU XD, QIAN YJ, DAI JJ. ASFV pD345L protein negatively regulates NF- κ B signalling by inhibiting IKK kinase activity[J]. Veterinary Research, 2022, 53(1): 1-13.
- [8] WANG XX, WU J, WU YT, CHEN HJ, ZHANG SF, LI JX, XIN T, JIA H, HOU SH, JIANG YT, ZHU HF, GUO XY. Inhibition of cGAS-STING-TBK1 signaling pathway by DP96R of ASFV China 2018/1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 506(3): 437-443.
- [9] LIU XL, AO D, JIANG S, XIA NW, XU YL, SHAO Q, LUO J, WANG H, ZHENG WL, CHEN NH, MEURENS F, ZHU JZ. African swine fever virus A528R inhibits TLR8 mediated NF- κ B activity by targeting p65 activation and nuclear translocation[J]. Viruses, 2021, 13(10): 2046.
- [10] ZHANG ZQ, YUAN B, BAO MS, LU N, KIM T, LIU YJ. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells[J]. Nature Immunology, 2011, 12(10): 959-965.
- [11] 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[J]. Nature Immunology, 2009, 10(10): 1065-1072.
- [12] JAKOBSEN MR, PALUDAN SR. IFI16: at the interphase between innate DNA sensing and genome regulation[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2014, 25(6): 649-655.
- [13] TAKAOKA A, WANG ZC, CHOI MK, YANAI H, NEGISHI H, BAN T, LU Y, MIYAGISHI M, KODAMA T, HONDA K, OHBA Y, TANIGUCHI T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response[J]. Nature, 2007, 448(7152): 501-505.
- [14] SUN LJ, WU JX, DU FH, CHEN X, CHEN ZJ. Cyclic

- GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 786-791.
- [15] SEO GJ, KIM C, SHIN WJ, SKLAN EH, EOH H, JUNG JU. TRIM56-mediated monoubiquitination of cGAS for cytosolic DNA sensing[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 613.
- [16] GUI X, YANG H, LI T, TAN XJ, SHI PQ, LI MH, DU FH, CHEN ZJ. Autophagy induction *via* STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway[J]. *Nature*, 2019, 567(7747): 262-266.
- [17] ISHIKAWA H, MA Z, BARBER GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity[J]. *Nature*, 2009, 461(7265): 788-792.
- [18] ZHANG YY, KE JN, ZHANG JY, YANG JJ, YUE HX, ZHOU XT, QI Y, ZHU RN, MIAO FM, LI Q, ZHANG F, WANG Y, HAN X, MI LJ, YANG JM, ZHANG SF, CHEN T, HU RL. African swine fever virus bearing an I226R gene deletion elicits robust immunity in pigs to African swine fever[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(23): 1-16.
- [19] MCNAB F, MAYER-BARBER K, SHER A, WACK A, O'GARRA A. Type I interferons in infectious disease[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(2): 87-103.
- [20] LI D, YANG WP, LI LL, LI P, MA Z, ZHANG J, QI XL, REN JJ, RU Y, NIU QL, LIU ZJ, LIU XT, ZHENG HX. African swine fever virus MGF-505-7R negatively regulates cGAS-STING-mediated signaling pathway[J]. *The Journal of Immunology*, 2021, 206(8): 1844-1857.
- [21] LI D, ZHANG J, YANG WP, LI P, RU Y, KANG WF, LI LL, RAN Y, ZHENG HX. African swine fever virus protein MGF-505-7R promotes virulence and pathogenesis by inhibiting JAK1- and JAK2-mediated signaling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 297(5): 101190.
- [22] ZHUO YS, GUO ZH, BA TT, ZHANG C, HE LH, ZENG CP, DAI HC. African swine fever virus MGF360-12L inhibits type I interferon production by blocking the interaction of importin α and NF- κ B signaling pathway[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(2): 176-186.
- [23] WANG Y, CUI S, XIN T, WANG XX, YU HN, CHEN SY, JIANG YJ, GAO XT, JIANG YT, GUO XY, JIA H, ZHU HF. African swine fever virus MGF360-14L negatively regulates type I interferon signaling by targeting IRF3[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 11: 818969.
- [24] Yang KD, HUANG QT, WANG RY, ZENG Y, CHENG MY, XUE Y, SHI CW, YE LP, YANG WT, JIANG YL, WANG JZ, HUANG HB, CAO X, YANG GL, WANG CF. African swine fever virus MGF505-11R inhibits type I interferon production by negatively regulating the cGAS-STING-mediated signaling pathway[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 263: 109265.
- [25] CORREIA S, VENTURA S, PARKHOUSE RM. Identification and utility of innate immune system evasion mechanisms of ASFV[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 87-100.
- [26] STONE SS, HESS WR. Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1967, 28(123): 475-481.
- [27] ARGILAGUET JM, PÉREZ-MARTÍN E, GALLARDO C, SALGUERO FJ, BORREGO B, LACASTA A, ACCENSI F, DÍAZ I, NOFRARÍAS M, PUJOLS J, BLANCO E, PÉREZ-FILGUEIRA M, ESCRIBANO JM, RODRÍGUEZ F. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells[J]. *Vaccine*, 2011, 29(33): 5379-5385.
- [28] SUNWOO SY, PÉREZ-NÚÑEZ D, MOROZOV I, SÁNCHEZ E, GAUDREAULT N, TRUJILLO J, MUR L, NOGAL M, MADDEN D, URBANIAK K, KIM I, MA WJ, REVILLA Y, RICHT J. DNA-protein vaccination strategy does not protect from challenge with African swine fever virus Armenia 2007 strain[J]. *Vaccines*, 2019, 7(1): 12.
- [29] NEILAN JG, ZSAK L, LU Z, Burrage TG, Kutish GF, Rock DL. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection[J]. *Virology*, 2004, 319(2): 337-342.
- [30] HONG JX, CHI XJ, YUAN X, WEN FX, RAI KR, WU L, SONG ZB, WANG S, GUO GJ, CHEN JL. I226R protein of African swine fever virus is a suppressor of innate antiviral responses[J]. *Viruses*, 2022, 14(3): 575.

(本文责编 郝丽芳)