

综述



杨荟, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心研究员、博士生导师, 国家“海外高层次人才引进计划”青年项目获得者。实验室主要从事核酸免疫的基础研究和核酸靶向技术的应用转化。研究聚焦于核酸免疫过程中重要的非编码核酸、蛋白质和蛋白质-核酸复合物的功能和机制, 为相关疾病的发生、发展和治疗提供理论基础, 基于机理的发现为核酸靶向技术的开发和改造提供指导信息。

原核和真核生物病毒RNA免疫识别系统的保守性与相似性

王蓓蓓, 杨 荟*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所,
核糖核酸功能与应用重点实验室, 中国科学院大学, 上海 200031)

摘要: 防御病毒和病原体是生物的基本功能, 细菌、古细菌和真核生物进化出复杂的核酸免疫系统抵御病原体的威胁。越来越多的研究表明, 许多免疫系统的核心机制在真核生物和原核生物中保守。本文综述了原核和真核生物之间保守的病原RNA免疫识别系统, 重点介绍了这些免疫系统的保守成分、作用机制以及进化关系。

关键词: 核酸免疫; 真核生物; 原核生物; 进化保守性

Conservation and similarity of nucleic acid immunity against viral RNA in prokaryotes and eukaryotes

WANG Beibei, YANG Hui*

(Key Laboratory of RNA Innovation, Science and Engineering, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Both prokaryotes (bacteria and archaea) and eukaryotes have evolved diverse immune systems to defend against threats from mobile genetic elements (MGEs) including plasmids, transposons, and pathogens. Recent studies have identified the conservation and similarities between prokaryotic and eukaryotic immune systems across all kingdoms of life. In this review, we summarize the shared nucleic acid immunity, focusing on the conserved components and mechanisms of RNA-sensing immune systems, which helps to understand the common evolutionary relationships of immune systems across different life forms.

收稿日期: 2024-07-10

基金项目: 中国科学院先导项目(XDB0570300); 国家重点研发计划项目(2023YFA0915600); 国家自然科学基金项目(32171266, 31971135); 中国科学院青年团队项目(YSBR-009)

第一作者: E-mail: wangbeibei2018@sibcb.ac.cn

*通信作者: E-mail: yanghui@sibcb.ac.cn

Key Words: nucleic acid immunity; eukaryotes; prokaryotes; evolutionary conservation

病毒是自然界数量最多、分布最广的生物。为了免受病毒、病原体的侵害, 宿主细胞进化出了复杂的免疫系统(分为天然免疫和适应性免疫), 识别并清除病原核酸。天然免疫在很大程度上是不变的, 识别保守的病原体特征, 激发快速的免疫反应。适应性免疫在不同种群中各不相同, 识别特定的病原体^[1]。原核生物和真核生物具有共同的、保守的天然免疫和适应性免疫系统来抵御病原体的入侵, 多种免疫组分和免疫机制在进化过程中是保守的^[2]。核酸免疫系统由一系列感应蛋白组成, 真核生物天然免疫系统的感应蛋白在检测到病毒分子之后, 激活抗病毒蛋白的表达和干扰素反应。这些核心组分与原核生物先天性免疫系统中的核酸感应蛋白之间存在保守性和相似性。它们通常是单独的蛋白质或分子, 但可能涉及多个免疫过程。原核生物的抗病毒途径可能是真核生物抗病毒途径古老的进化根源。

本文将对原核生物和真核生物病原RNA免疫识别系统中免疫成分和通路的共同点和保守性进行概述, 重点讨论这些免疫系统的关键组分和保守机制, 主要涉及环GMP-AMP合成酶(cGAS)-干扰素基因刺激因子(STING)信号通路、抗病毒蛋白Viperin家族、含有Toll/IL-1受体(TIR)结构域的病原体受体蛋白、Argonaute介导的RNA干扰等天然免疫系统以及RNA介导的CRISPR-Cas适应性免疫途径(图1)。

1 cGAS-STING信号通路与CBASS免疫系统

cGAS-STING信号通路是哺乳动物细胞内重要的免疫应答机制。cGAS感知细胞内异常存在的双链DNA(dsDNA), 催化GTP和ATP形成第二信使2',3'-cyclic-GMP-AMP(cGAMP)^[3-9](图1)。随后, cGAMP激活位于内质网膜上的STING, 引起STING二聚化并产生构象变化, 从而招募下游TANK结合激酶1(TANK binding kinase 1, TBK1)和干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)。TBK1磷酸化IRF3, 激活的IRF3二聚体进

入细胞核诱导I型干扰素(interferon, IFN)的表达。STING还能激活转录因子核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B), 诱导促炎性细胞因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的表达^[10-12]。cGAS-STING信号通路通过cGAMP分子实现信号级联放大, 建立起有效的天然免疫应答, 对抵御病原微生物的入侵和维持组织稳态具有重要意义。

真核生物编码多种cGAS样蛋白, 其中部分同源蛋白作为核酸感应蛋白以相似的机制识别细胞质的双链RNA(dsRNA)并产生信号分子。人cGAS样同源蛋白2'-5'寡聚腺苷酸合成酶(2'-5'-oligoadenylate synthetase, OAS)识别dsRNA产生线性2'-5'寡聚腺苷酸, 激活RNase L, 破坏入侵的RNA病毒和宿主RNA^[13,14]。昆虫cGAS样受体(cGLRs)是一个多样化的受体识别家族, 如*T. castaneum* cGLR(Tc-cGLR)识别dsRNA产生3',2'-cGAMP^[15,16], 提示真核生物cGLRs具有独立且不同的免疫功能。

cGAS在细菌中的同源蛋白被称为cGAS/dncv样核苷酸转移酶(CD-NTase), 在噬菌体感染时产生cGAMP或其他环寡核苷酸信号分子(如c-di-GMP、cUAMP、cAAGMP等)激活免疫反应^[17,18]。这类以环寡核苷酸为信号分子的免疫系统被称为基于环寡核苷酸的抗噬菌体信号系统(cyclic oligonucleotide-based anti-phage signaling system, CBASS系统)^[17-20]。CBASS系统主要由两部分组成: 一是CD-NTase, 负责感知病毒DNA或RNA, 产生环状寡核苷酸作为第二信使; 二是效应蛋白, 接受环状寡核苷酸信号, 激活下游一系列免疫反应^[17,18], 引起细胞膜的降解、细胞膜孔洞的形成以及噬菌体和宿主DNA的裂解等, 最终导致细菌死亡或生长抑制, 阻止病毒的进一步增殖^[17,20]。

CBASS系统具有不同结构和功能的效应蛋白。研究发现, CD-NTase编码的操纵子内存在STING同源蛋白, 同样可以与CD-NTase产生的环二核苷酸结合进而被激活。下游信号通路如何导

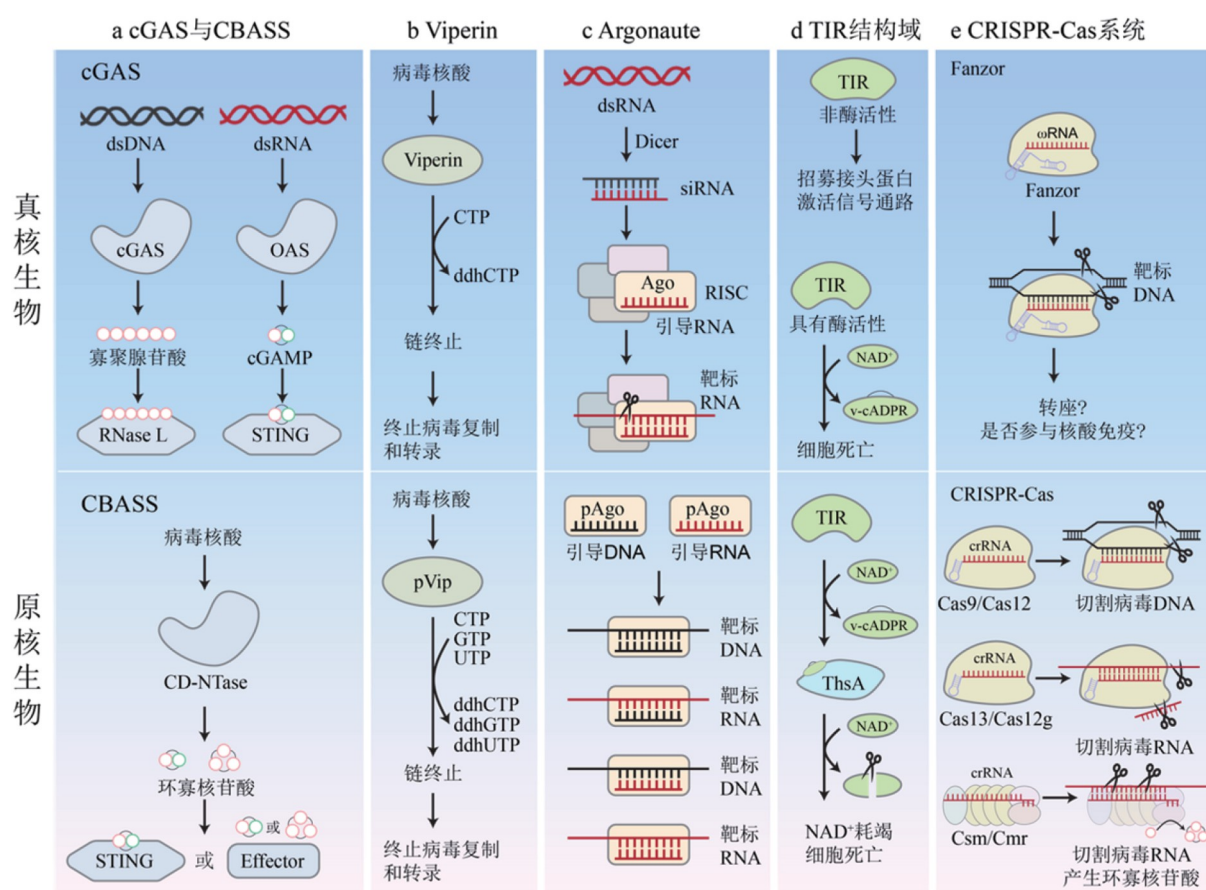


图1 原核生物和真核生物共享的核酸免疫系统

致细胞死亡还有待进一步研究。真核和细菌来源的cGAS晶体结构比较结果表明,它们在结构上具有明显的保守性,真核和原核cGAS具有共同的祖先蛋白^[17,21,22]。细菌STING与动物STING也具有明显的结构同源性^[23],提示它们也可能来自共同的祖先蛋白。但值得注意的是,在古细菌和植物中没有发现STING结构域,推测真核生物可能在进化早期获得了原始的STING样蛋白,经历后生物特异性修饰,实现了从直接导致细胞死亡的功能进化到抗病毒转录调节功能的转换^[23]。

除STING外, CBASS系统中还有一些效应蛋白具有典型的真核生物结构域^[20],提示它们与真核生物免疫系统的相关性。例如, II型CBASS系统的效应蛋白Cap2和Cap3含有泛素相关结构域^[19], Cap2含有泛素激活E1样结构域和泛素耦合E2样结构域, Cap3含有JAB/JAMM家族异肽酶结构域。在真核生物中,泛素激活酶E1和泛素耦合酶E2介导泛素和泛素样蛋白与靶标蛋白结合,导

致靶标蛋白降解、酶激活、定位变化等,而JAB/JAMM家族异肽酶可以移除靶标蛋白上的泛素。研究表明, Cap2介导的免疫反应类似于人类细胞中E1和E2介导的RIG- I (retinoid acid inducible gene- I)免疫反应,后者在病原体感知泛素化,以减轻自身抑制结构域并实现稳健的信号传导^[19,24-27]。E1和E2结构域在细菌和哺乳动物免疫反应中都是重要的调节因子,通过介导的泛素化修饰增强或抑制免疫反应^[25]。

2 Viperin

真核Viperin(virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, interferon-inducible)是定位于内质网膜上的干扰素诱导蛋白,是天然免疫的重要组分,具有广谱的抗病毒活性,通过破坏病毒复制复合物的形成来抑制病毒复制,在抑制多种病毒复制方面起着至关重要的作用^[28-31]。在病毒感染期间, Viperin不能直接感

应dsRNA, 但它可以响应模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)如RIG- I、MDA5和Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)等感应病毒dsRNA后产生的信号, 通过 I 型干扰素(如IFN- α 、IFN- β)和 III 型干扰素(如IFN- λ)诱导Viperin的表达。Viperin在不同物种间整体保守性高, 含有N端的 α 螺旋结构域、S-腺苷甲硫氨酸酶结构域和C端的保守结构域, 催化胞嘧啶三磷酸(cytidine triphosphate, CTP)转化为3'-脱氧-3',4'-二脱氢-CTP(ddhCTP)。由于ddhCTP核糖上缺乏3'-羟基, 它可以作为病毒RNA依赖性RNA聚合酶的链终止子, 从而限制RNA病毒基因组复制和病毒基因转录^[32]。除了直接的抗病毒作用外, Viperin蛋白还可以通过影响细胞因子的产生和信号通路来调节免疫反应^[31,33]。

细菌和古细菌也存在Viperin。原核Viperin(pVip)与人源Viperin在序列和功能上有明显的一致性。pVip催化底物更加多样。除了可以将CTP转化为ddhCTP, 一些pVip蛋白可以产生ddhGTP或ddhUTP, 抑制病毒RNA链的合成, 保护细菌免受噬菌体感染^[34]。pVip可以保护细菌不受T7、lambda和T1噬菌体的侵染^[34], 但它如何被激活目前并不清楚, 是否也响应dsRNA激活的信号也不明确。系统发育树分析表明, 所有真核Viperin在pVip系统发育树中形成了一个单系分支, 其最近的共同祖先位于一个古细菌物种的pVip蛋白组成的分支中, 并且真核Viperin和pVip表现出结构保守性, 表明真核Viperin可能是从原核生物中获得的^[32,34,35]。

3 Argonaute介导的RNA干扰途径

RNA干扰(RNA interference, RNAi)途径是介导转录后基因沉默的天然免疫通路, 在真核生物中是高度保守的, 在真菌、植物、无脊椎动物、哺乳动物中发挥关键抗病毒作用^[36-39]。Dicer和Argonaute(Ago)是真核生物RNAi途径的两个核心成分。在RNAi抗病毒过程中, 病毒RNA复制所产生的dsRNA被宿主Dicer蛋白识别并切割成长度为21~25个核苷酸的短双链RNA。这些小RNA被装载到含有Ago的RISC(RNA induced silencing complex)复合体中, 单链小RNA作为引导RNA通过碱基互

补配对方式引导Ago结合并切割靶标RNA分子^[40-42], 或者抑制靶标RNA的转录和翻译等, 从而达到抗病毒的目的^[40,43,44]。被切割的靶标RNA被释放后, RISC被回收进行下一轮反应。介导细胞内RNAi的小RNA分为三大类: 小干扰RNA(small interfering RNAs, siRNA)、miRNA(microRNA)和piRNA(PIWI-interacting RNA)。这三类小RNA的来源和功能均有所差别^[45-48]。RNAi是植物主要的抗病毒途径^[37], 在无脊椎动物防御病毒方面也起着至关重要的作用^[40,49], 是脊椎动物抗病毒免疫的重要组成部分^[38,50]。经典的RNAi主要指siRNA介导的由Ago2完成的靶标RNA沉默, 广义的基因沉默则涵盖了由miRNA、siRNA和piRNA介导的通过Ago进行的沉默机制。

Ago很早就被发现存在于细菌和古细菌中^[51-54], 原核Ago(prokaryotic Argonaute, pAgo)是原核生物天然免疫系统的重要成员。与真核生物不同的是, 大多数已被鉴定的具有核酸酶功能的pAgo特异性地靶向DNA而不是RNA^[55-59], 抵御外源DNA如噬菌体DNA和质粒等的入侵^[60-62]。有研究发现, pAgo的功能比真核Ago的功能可能更加多样化, pAgo不仅参与由引导DNA介导的DNA靶向干扰, 还可以参与引导RNA介导的RNA靶向或者DNA靶向干扰, 实现识别和切割目标DNA或RNA的功能^[63,64]。根据结构域的组成, pAgo被分为长A pAgo(long-A pAgo)、长B pAgo(long-B pAgo)和短pAgos(short pAgo)三个亚型^[65]。

真核Ago和原核长Ago都含有N端结构域、PIWI(P-element induced wimpy testis)、MID(middle)和PAZ(PIWI/Argonaute/Zwille)四个结构域和L1、L2两个连接区域。N-PAZ和MID-PIWI结构域之间形成一个容纳引导和靶标核酸的口袋。pAgo的N端结构域是高度可变的, 在目标识别过程中, N端结构域解除引导-靶标杂交双链。MID和PAZ结构域与引导链的5'和3'端结合, 靶标链的5'端被PIWI结构域识别^[66]。相较真核Ago, 部分原核pAgo具有更加疏水的MID结构域, 促进蛋白质和DNA结合^[67]。向导RNA的第2-8位核苷酸为种子区域, 向导链和靶标链之间的进一步退火伴随向导链的3'端被PAZ结构域释放。完成配对后, Ago通过PIWI结构域在配对双链的第10个和第11个核苷酸之间进

行切割^[68]。

大多数long-A pAgo的催化口袋具有切割活性,能够切割靶标核酸。而long-B pAgo的催化口袋大部分发生突变^[69]。突变的pAgo在发挥功能时会招募辅助蛋白帮助其发挥功能。有切割活性的pAgo通过序列特异性识别外源核酸对其进行剪切,防止病毒的复制和扩散,使细菌免受外来遗传元件的侵害。无切割活性的pAgo也可以与其他效应蛋白偶联,或激活下游蛋白,诱发宿主细胞死亡或休眠,以防止病毒繁殖^[61]。短pAgo仅包含MID结构域和一个催化结构域突变的PIWI结构域,其N端结构域和PAZ结构域缺失^[65]。这类pAgo蛋白的操纵子中通常含有一个编码短Ago的基因和一个编码效应蛋白的基因。效应蛋白通常含有两部分结构域,一个是APAZ(analog of PAZ)结构域,更加类似于N端结构域的功能而不是PAZ结构域的功能^[51];另一个结构域作为效应蛋白发挥不同功能,这些与APAZ结构域融合的基因编码的蛋白质往往会与Ago蛋白形成复合物发挥作用,弥补了短pAgo蛋白本身催化活性不足导致的功能缺失^[51],如SIR2(silent information regulator 2)、TIR(Toll-interleukin-1 receptor)或DUF4365结构域等。SIR2和TIR结构域具有NAD(P)酶活性,Ago识别底物后激活NAD(P)酶活性裂解NAD⁺,使细胞死亡;DUF4365结构域与Mrr亚家族PD-(D/E)XK核酸酶的RecB样结构域相似,随机切割细胞质中的核酸,导致细胞生长抑制或死亡^[65,70]。

综上,基于Ago的天然免疫系统在原核生物和真核生物中保持了其核心功能和主要结构域,说明其在进化中的保守性。与真核Ago相比,pAgo的功能多样性更大,这表明pAgo蛋白首先在原核生物中进化和多样化,后来才被真核生物获得^[62,71]。系统发育分析支持古细菌Ago机制可能是真核RNAi的原始祖先的观点,真核RNAi途径可能在后来的进化中获得了额外的成分,如Dicer蛋白等^[51,62,72]。在真核生物中,Ago除了抗病毒的免疫功能外,还通过多种方式参与基因的转录后调控,这些功能的实现涉及多种不同蛋白质和蛋白质复合物的参与,从另一个角度体现进化产生的功能多样化。解析病毒介导的RNAi途径与机制有助于寻找新的靶点开发抗病毒药物,推动治疗手

段的发展。同时,Ago的序列特异性识别能力在核酸检测、基因突变检测、荧光原位杂交等方面有着巨大的应用潜力。

4 TIR结构域

天然免疫中病毒RNA感应受体TLR的共同特征是都含有一个TIR结构域。TIR结构域介导下游信号的传递,是天然免疫系统信号通路中发挥重要作用的蛋白质结构域,长期以来被认为是整个进化树中天然免疫的一个重要和广泛的模块^[73,74]。TIR结构域最初是在真核生物中发现的,是第一个被认为在细菌和人类天然免疫途径中都存在的免疫成分。TIR结构域是许多免疫途径的核心组成部分,可以分为酶活和非酶活两种不同的TIR亚型^[75]。非酶活性的TIR结构域主要存在于跨膜蛋白的胞内区,通过一个配体蛋白协调信号传导^[76]。当配体结合时,受体蛋白的TIR结构域发生构象变化,使它们能够与含有类似TIR结构域的蛋白质相互作用。TIR结构域促进同型相互作用,即与其他接头蛋白的TIR结构域相互作用。TIR-TIR相互作用招募接头蛋白,启动一系列信号事件,导致转录因子如NF- κ B和IRF3的激活^[77,78]。这些转录因子随后促进炎症细胞因子、趋化因子和其他免疫反应基因的表达。具有酶活性的TIR结构域广泛分布于细菌、古细菌和真核生物中^[79,80],具有催化消耗NAD⁺的活性,参与免疫反应的两个步骤:一是信号放大,通过裂解NAD⁺产生第二信使^[81];二是能够通过降解NAD⁺来改变细胞正常的代谢或生理状态^[82,83],NAD⁺和NADH的消耗会导致细胞死亡,从而间接抑制病原体的复制。植物TIR结构域能够将NAD⁺加工成环腺嘌呤二磷酸核糖的变体(v-cADPR)^[84-86],v-cADPR分子介导了从最初的病原体识别到最终免疫介导的细胞死亡的信号传递过程^[87,88],产生“超敏反应”导致感染细胞和邻近细胞的死亡^[84]。

细菌Thoeris系统是抵御噬菌体侵染的天然免疫系统,它的关键组分ThsB含有一个TIR结构域^[89],切割NAD⁺产生类似于植物v-cADPR的cADPR异构体,cADPR异构体作为信号分子结合并激活Thoeris系统中的组分ThsA,耗尽细胞内的NAD⁺使细胞死亡^[81]。除了Thoeris噬菌体防御系

统, 细菌TIR结构域也作为效应物参与其他免疫反应, 包括Pycsar(pyrimidine cyclase system for anti-phage resistance)系统^[79]、短pAgo系统、CBASS系统和CRISPR-Cas系统等, 终止感染^[23]。其中, 短pAgo系统、CBASS系统和CRISPR-Cas系统都可以通过直接感应病毒dsRNA后激活TIR结构域的活性; Thoeris和Pycsar系统的免疫反应起始机制还不明确。

代谢NAD⁺的活性是TIR结构域从原核生物到真核生物整个生命进化树中都保守的共同特征, 表明TIR结构域是一种起源于细菌的古老免疫模块。真核生物天然免疫系统中TIR部分可能起源于原核生物对噬菌体的防御, 而非酶活TIR结构域仅限于动物和植物细胞, 表明这种修饰是后来进化的。

5 CRISPR-Cas系统

CRISPR-Cas系统是细菌和古细菌的获得性免疫系统, 与先天性免疫系统相比, 最显著的特点是能够存储外源病毒或质粒的遗传信息, 产生“免疫记忆”。当外源核酸再次入侵时, 该系统能在RNA的介导下序列特异性识别并切割外源DNA或RNA, 从而阻止外源病毒或质粒的入侵。CRISPR-Cas系统发挥功能主要分为三个阶段: 间隔区的获取、crRNA的加工以及外源核酸的干扰^[90]。在间隔区获取的阶段, Cas1和Cas2获取外源DNA片段即前间隔区, 并将其整合到CRISPR序列第一个重复区中, 形成新的间隔区, 产生免疫记忆^[91-93]。在crRNA的加工阶段, CRISPR序列转录形成CRISPR RNA前体(precursor CRISPR RNA, pre-crRNA), 在宿主RNA酶Ⅲ(RNase Ⅲ)或Cas蛋白的作用下加工产生成熟的CRISPR RNA(crRNA), 每个成熟的crRNA都包含一个重复区和一个间隔区^[94-96]。在外源核酸的干扰阶段, 成熟的crRNA能够与一个或多个Cas蛋白组装形成效应复合物, 通过crRNA间隔区序列特异性识别与其互补配对的外源核酸, 并通过核酸内切酶对DNA或RNA进行切割^[97-100]。

CRISPR-Cas系统中的Ⅲ型Csm/Cmr、Ⅵ型Cas13和Ⅴ-G型Cas12g系统都可以在crRNA的引导下序列特异性识别单链RNA(ssRNA)。已经有大量

结构生物学的研究阐明了这三类系统的序列特异性识别和底物切割机制, 说明三者的作用机制各不相同。Csm/Cmr复合物识别并切割靶标ssRNA的同时, 产生环寡核苷酸作为第二信使, 激活下游不同的效应蛋白(如核酸酶、蛋白酶、离子通道等)^[101]。Cas13识别靶标ssRNA后激活核酸内切酶活性, 在配对的靶标ssRNA被释放前, Cas13持续处于激活状态, 随机切割环境中的非靶标ssRNA^[101,102]。Csm/Cmr复合物通过环寡核苷酸激活的信号通路和Cas13的随机切割活性, 都会导致细菌的生长抑制或者死亡, 避免病毒的扩增, 实现群体免疫。Cas12g识别靶标ssRNA后激活核酸内切酶活性, 与Cas13不同的是, 它可以随机切割环境中的RNA和DNA^[103], 但是Cas12g随机切割底物的偏好性以及抗噬菌体的功能还有待进一步研究。

研究表明, 获得性CRISPR-Cas系统只存在于原核生物中, 真核生物中缺失这类系统的一种可能性是进化成早期真核生物的一种原核生物不编码这类系统, 另一种可能性是CRISPR-Cas系统在形成第一个真核生物的细胞融合事件后引起不相容性或自身免疫问题而被选择性移除^[71]。但是随着对真核生物和原核生物免疫系统和进化关系研究的深入, 有研究表明, Cas12与真核生物Fanzor起源于同一祖先TnpB。Cas12、TnpB和Fanzor都是RNA引导的DNA内切酶^[104-107], 以相似机制识别序列特异性识别dsDNA, 暗示这类系统在进化上的保守性和相似性。Fanzor属于转座子IS200/IS605家族TnpB蛋白, 与原核生物的Tnp8具有同源性, 从低等真核生物如真菌、藻类、变形虫等到高等真核生物如蛤蜊、人等都发现了Fanzor的存在^[105,108]。Fanzor所在基因座中转录的非编码RNA(ω RNA)与Fanzor形成复合物, 发挥与crRNA类似功能, 通过序列互补配对的方式识别靶标并切割dsDNA, 产生双链断裂。Cas12a、TnpB和Fanzor与各自的引导RNA及靶标dsDNA复合物的结构比较发现, 复合物中的蛋白质和RNA整体结构都具有一定的相似性, Cas12、TnpB和Fanzor通过结构和序列特异性识别各自引导RNA中的保守区域, 都是通过单一的RuvC结构域分别切割DNA的两条链^[109-111]。Cas12a(1 000~1 200个氨基酸)、

TnpB(约400个氨基酸)和Fanzor(约600个氨基酸)三者相比, TnpB和Fanzor相对分子质量较小, 它们的 ω RNA相对分子质量大, 而Cas12a的crRNA相对分子质量小, 这暗示了这类蛋白质和引导RNA可能发生共进化^[105,108-111]。Fanzor被编码在真核生物基因组的转座子中, 系统发育分析表明, Fanzor基因可能通过水平基因转移从细菌跳跃到了真核生物中, 但Fanzor是否参与核酸免疫, 及其在真核细胞中发挥的生物学功能还需要更加深入细致的研究。

6 结语与展望

本文讨论了原核生物和真核生物免疫系统的共同点和相似性以及真核生物先天性免疫机制和适应性免疫机制的细菌起源。真核生物免疫系统的一些关键组分和机制具有古老的进化根源。这些组分起源于保护细菌免受噬菌体感染的原核基因, 包括cGAS-STING信号通路、抗病毒蛋白家族Viperin、TIR结构域蛋白、RNA干扰途径以及CRISPR-Cas系统等。细菌和真核生物共有的免疫成分很可能是水平基因转移的结果, 即不相关的供体和受体之间的DNA转移, 但如何实现基因的水平转移仍然有待研究。

近年来, 越来越多的噬菌体免疫途径被发现和研究, 我们对细菌免疫系统的了解也在不断深入。原核生物中的多种防御蛋白和防御体系在真核生物中同源和保守, 揭示了免疫系统的进化关系, 原核和真核防御系统之间的守恒将有助于破译人类新的抗病毒机制, 对未来人类免疫的机制研究具有重要意义。CRISPR-Cas系统对核酸的序列特异性识别和切割特性, 使得它们在基因编辑和核酸检测方面有着广泛的应用前景。TnpB和Fanzor也可以应用于人源细胞的基因编辑^[104,105], 而真核来源的Fanzor因相对分子质量小在递送方面更加具有应用潜力。Ⅲ型Csm/Cmr复合物通过环寡核苷酸可以激活TIR结构域, 如前所述的TIR结构域是从原核到真核都十分保守的结构域。此外, Cas13发挥内切酶活性的HPEN结构域, 也是一种广泛存在于原核和真核生物中的具有核酸结构能力的结构域。除Cas12和Fanzor外, 其他CRISPR-Cas系统是否在真核生物中也有同源蛋白的存在目

前并不清楚。深入研究免疫系统的保守性和进化关系可以帮助挖掘更多保守的核酸感应蛋白和核酸免疫系统, 从而开发更多新型基因编辑和核酸检测工具。了解生命各领域免疫成分的共同进化路径以及生物体限制病原体的成功策略将有助于未来开发激活人类免疫系统的治疗方法, 以精确治疗疾病。

参考文献

- [1] Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and non-pathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe*, 2009, 6(1): 10-21
- [2] Wein T, Sorek R. Bacterial origins of human cell-autonomous innate immune mechanisms. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(10): 629-638
- [3] Ablasser A, Goldeck M, Cavarlar T, et al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature*, 2013, 498(7454): 380-384
- [4] 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
- [5] Kato K, Omura H, Ishitani R, et al. Cyclic GMP-AMP as an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86(1): 541-566
- [6] 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
- [7] Keating SE, Baran M, Bowie AG. Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends Immunol*, 2011, 32(12): 574-581
- [8] Diner EJ, Burdette DL, Wilson SC, et al. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell Rep*, 2013, 3(5): 1355-1361
- [9] Hornung V, Latz E. Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(2): 123-130
- [10] Ablasser A, Chen ZJ. cGAS in action: expanding roles in immunity and inflammation. *Science*, 2019, 363(6431): eaat8657
- [11] Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(9): 501-521
- [12] Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol*, 2016, 17(10): 1142-1149

- [13] Kuchta K, Knizewski L, Wyrwicz LS, et al. Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel families and their representatives in human. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37 (22): 7701-7714
- [14] Sparrer KM, Gack MU. Intracellular detection of viral nucleic acids. *Curr Opin Microbiol*, 2015, 26: 1-9
- [15] Slavik KM, Morehouse BR, Ragucci AE, et al. cGAS-like receptors sense RNA and control 3'2'-cGAMP signalling in *Drosophila*. *Nature*, 2021, 597(7874): 109-113
- [16] Holleufer A, Winther KG, Gad HH, et al. Two cGAS-like receptors induce antiviral immunity in *Drosophila*. *Nature*, 2021, 597(7874): 114-118
- [17] Whiteley AT, Eaglesham JB, de Oliveira Mann CC, et al. Bacterial cGAS-like enzymes synthesize diverse nucleotide signals. *Nature*, 2019, 567(7747): 194-199
- [18] Govande AA, Duncan-Lowey B, Eaglesham JB, et al. Molecular basis of CD-NTase nucleotide selection in CBASS anti-phage defense. *Cell Rep*, 2021, 35(9): 109206
- [19] Cohen D, Melamed S, Millman A, et al. Cyclic GMP-AMP signalling protects bacteria against viral infection. *Nature*, 2019, 574(7780): 691-695
- [20] Millman A, Melamed S, Amitai G, et al. Diversity and classification of cyclic-oligonucleotide-based anti-phage signalling systems. *Nat Microbiol*, 2020, 5(12): 1608-1615
- [21] Kranzusch PJ, Lee ASY, Wilson SC, et al. Structure-guided reprogramming of human cGAS dinucleotide linkage specificity. *Cell*, 2014, 158(5): 1011-1021
- [22] Zhu D, Wang L, Shang G, et al. Structural biochemistry of a vibrio cholerae dinucleotide cyclase reveals cyclase activity regulation by folates. *Mol Cell*, 2014, 55(6): 931-937
- [23] Morehouse BR, Govande AA, Millman A, et al. STING cyclic dinucleotide sensing originated in bacteria. *Nature*, 2020, 586(7829): 429-433
- [24] Jenson JM, Li T, Du F, et al. Ubiquitin-like conjugation by bacterial cGAS enhances anti-phage defence. *Nature*, 2023, 616(7956): 326-331
- [25] Oh E, Akopian D, Rape M. Principles of ubiquitin-dependent signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2018, 34 (1): 137-162
- [26] Ledvina HE, Ye Q, Gu Y, et al. An E1-E2 fusion protein primes antiviral immune signalling in bacteria. *Nature*, 2023, 616(7956): 319-325
- [27] Burroughs AM, Zhang D, Schäffer DE, et al. Comparative genomic analyses reveal a vast, novel network of nucleotide-centric systems in biological conflicts, immunity and signaling. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(22): 10633-10654
- [28] Chin KC, Cresswell P. Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(26): 15125-15130
- [29] Helbig KJ, Beard MR. The role of viperin in the innate antiviral response. *J Mol Biol*, 2014, 426(6): 1210-1219
- [30] Rivera-Serrano EE, Gizzi AS, Arnold JJ, et al. Viperin reveals its true function. *Annu Rev Virol*, 2020, 7(1): 421-446
- [31] Seo JY, Yaneva R, Cresswell P. Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that regulates virus replication. *Cell Host Microbe*, 2011, 10(6): 534-539
- [32] Fenwick MK, Li Y, Cresswell P, et al. Structural studies of viperin, an antiviral radical SAM enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(26): 6806-6811
- [33] Gizzi AS, Grove TL, Arnold JJ, et al. A naturally occurring antiviral ribonucleotide encoded by the human genome. *Nature*, 2018, 558(7711): 610-614
- [34] Bernheim A, Millman A, Ofir G, et al. Prokaryotic viperins produce diverse antiviral molecules. *Nature*, 2021, 589(7840): 120-124
- [35] Lachowicz JC, Gizzi AS, Almo SC, et al. Structural insight into the substrate scope of viperin and viperin-like enzymes from three domains of life. *Biochemistry*, 2021, 60(26): 2116-2129
- [36] Wu J, Yang J, Cho WC, et al. Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles. *J Adv Res*, 2020, 24: 317-324
- [37] Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*, 2004, 431(7006): 356-363
- [38] Ding SW. RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(9): 632-644
- [39] Haasnoot J, Westerhout EM, Berkhout B. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(12): 1435-1443
- [40] Guo Z, Li Y, Ding SW. Small RNA-based antimicrobial immunity. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(1): 31-44
- [41] Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys*, 2013, 42(1): 217-239
- [42] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, 409(6818): 363-366
- [43] Raja P, Jackel JN, Li S, et al. Arabidopsis double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *J Virol*, 2014, 88(5): 2611-2622
- [44] Raja PV, Huang J, Germanwala AV, et al. Microsurgical

- clipping and endovascular coiling of intracranial aneurysms: a critical review of the literature. *Neurosurgery*, 2008, 62(6): 1187-1202
- [45] Shi J, Zhou T, Chen Q. Exploring the expanding universe of small RNAs. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(4): 415-423
- [46] Ghildiyal M, Seitz H, Horwich MD, et al. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science*, 2008, 320(5879): 1077-1081
- [47] Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, et al. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev*, 2008, 22(20): 2773-2785
- [48] Bartel DP. MicroRNAs. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297
- [49] Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*, 2002, 296(5571): 1319-1321
- [50] Berkhout B. RNAi-mediated antiviral immunity in mammals. *Curr Opin Virol*, 2018, 32: 9-14
- [51] Makarova KS, Wolf YI, van der Oost J, et al. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol Direct*, 2009, 4(1): 29
- [52] Parker JS, Roe SM, Barford D. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J*, 2004, 23(24): 4727-4737
- [53] Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, et al. Crystal structure of argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 2004, 305(5689): 1434-1437
- [54] Yuan YR, Pei Y, Ma JB, et al. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell*, 2005, 19(3): 405-419
- [55] Hegge JW, Swarts DC, Chandrass SD, et al. DNA-guided DNA cleavage at moderate temperatures by *Clostridium butyricum* Argonaute. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(11): 5809-5821
- [56] Kuzmenko A, Yudin D, Ryazansky S, et al. Programmable DNA cleavage by Ago nucleases from mesophilic bacteria *Clostridium butyricum* and *Limnithrix rosea*. 2019, 47(11): 5822-5836
- [57] Sheng G, Zhao H, Wang J, et al. Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(2): 652-657
- [58] Swarts DC, Hegge JW, Hinojo I, et al. Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(10): 5120-5129
- [59] Zander A, Willkomm S, Ofer S, et al. Guide-independent DNA cleavage by archaeal Argonaute from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Nat Microbiol*, 2017, 2(6): 17034
- [60] Kuzmenko A, Oguienko A, Esiyunina D, et al. DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease. *Nature*, 2020, 587(7835): 632-637
- [61] Olovnikov I, Chan K, Sachidanandam R, et al. Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol Cell*, 2013, 51(5): 594-605
- [62] Swarts DC, Jore MM, Westra ER, et al. DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*, 2014, 507(7491): 258-261
- [63] Doxzen KW, Doudna JA, Paci E. DNA recognition by an RNA-guided bacterial Argonaute. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177097
- [64] Kropocheva E, Kuzmenko A, Aravin AA, et al. A programmable pAgo nuclease with universal guide and target specificity from the mesophilic bacterium *Kurthia massiliensis*. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(7): 4054-4065
- [65] Ryazansky S, Kulbachinskiy A, Aravin AA, et al. The expanded universe of prokaryotic argonaute proteins. *mBio*, 2018, 9(6): e01935-18
- [66] Wang Y, Sheng G, Juranek S, et al. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature*, 2008, 456(7219): 209-213
- [67] Swarts DC, Makarova K, Wang Y, et al. The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(9): 743-753
- [68] Iwakawa H, Tomari Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Mol Cell*, 2022, 82(1): 30-43
- [69] Wang Y, Juranek S, Li H, et al. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature*, 2009, 461(7265): 754-761
- [70] Koopal B, Potocnik A, Mutte SK, et al. Short prokaryotic Argonaute systems trigger cell death upon detection of invading DNA. *Cell*, 2022, 185(9): 1471-1486.e19
- [71] Koonin EV. Evolution of RNA- and DNA-guided antiviral defense systems in prokaryotes and eukaryotes: Common ancestry vs convergence. *Biol Direct*, 2017, 12(1): 5
- [72] Shabalina S, Koonin E. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol*, 2008, 23(10): 578-587
- [73] Toshchakov VY, Neuwald AF. A survey of TIR domain sequence and structure divergence. *Immunogenetics*, 2020, 72(3): 181-203
- [74] Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors—taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(3): 165-

- 178
- [75] Nimma S, Gu W, Maruta N, et al. Structural evolution of TIR-Domain signalosomes. *Front Immunol*, 2021, 12: 784484
- [76] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(5): 353-364
- [77] Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, et al. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33(1): 257-290
- [78] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(7): 499-511
- [79] Tal N, Morehouse BR, Millman A, et al. Cyclic CMP and cyclic UMP mediate bacterial immunity against phages. *Cell*, 2021, 184(23): 5728-5739.e16
- [80] Ka D, Oh H, Park E, et al. Structural and functional evidence of bacterial antiphage protection by Thoeris defense system via NAD⁺ degradation. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2816
- [81] Ofir G, Herbst E, Baroz M, et al. Antiviral activity of bacterial TIR domains via immune signalling molecules. *Nature*, 2021, 600(7887): 116-120
- [82] Kibby EM, Conte AN, Burroughs AM, et al. Bacterial NLR-related proteins protect against phage. *Cell*, 2023, 186(11): 2410-2424
- [83] Gao LA, Wilkinson ME, Strecker J, et al. Prokaryotic innate immunity through pattern recognition of conserved viral proteins. *Science*, 2022, 377(6607): eabm4096
- [84] Burch-Smith TM, Dinesh-Kumar SP. The functions of plant TIR domains. *Sci STKE*, 2007, 2007(401): pe46
- [85] Horsefield S, Burdett H, Zhang X, et al. NAD⁺ cleavage activity by animal and plant TIR domains in cell death pathways. *Science*, 2019, 365(6455): 793-799
- [86] Wan L, Essuman K, Anderson RG, et al. TIR domains of plant immune receptors are NAD⁺-cleaving enzymes that promote cell death. *Science*, 2019, 365(6455): 799-803
- [87] Bayless AM, Nishimura MT. Enzymatic functions for Toll/Interleukin-1 receptor domain proteins in the plant immune system. *Front Genet*, 2020, 11: 539
- [88] Duxbury Z, Wang S, MacKenzie CI, et al. Induced proximity of a TIR signaling domain on a plant-mammalian NLR chimera activates defense in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(31): 18832-18839
- [89] Doron S, Melamed S, Ofir G, et al. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*, 2018, 359(6379): eaar4120
- [90] van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(7): 479-492
- [91] Sternberg SH, Richter H, Charpentier E, et al. Adaptation in CRISPR-Cas systems. *Mol Cell*, 2016, 61(6): 797-808
- [92] Amitai G, Sorek R. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(2): 67-76
- [93] Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 37: 67-78
- [94] Charpentier E, Richter H, van der Oost J, et al. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol Rev*, 2015, 39(3): 428-441
- [95] Carte J, Wang R, Li H, et al. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev*, 2008, 22(24): 3489-3496
- [96] Hochstrasser ML, Doudna JA. Cutting it close: CRISPR-associated endoribonuclease structure and function. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(1): 58-66
- [97] Plagens A, Richter H, Charpentier E, et al. DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes. *FEMS Microbiol Rev*, 2015, 39(3): 442-463
- [98] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338
- [99] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(3): 181-190
- [100] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71
- [101] van Beljouw SPB, Sanders J, Rodríguez-Molina A, et al. RNA-targeting CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(1): 21-34
- [102] Yang H, Patel DJ. Structures, mechanisms and applications of RNA-centric CRISPR-Cas13. *Nat Chem Biol*, 2024, 20(6): 673-688
- [103] Yan WX, Hunnewell P, Alfonse LE, et al. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science*, 2019, 363(6422): 88-91
- [104] Karvelis T, Druteika G, Bigelyte G, et al. Transposon-associated TnpB is a programmable RNA-guided DNA endonuclease. *Nature*, 2021, 599(7886): 692-696
- [105] Saito M, Xu P, Faure G, et al. Fanzor is a eukaryotic programmable RNA-guided endonuclease. *Nature*, 2023, 620(7974): 660-668
- [106] Yoon PH, Skopintsev P, Shi H, et al. Eukaryotic RNA-guided endonucleases evolved from a unique clade of bacterial enzymes. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(22): 11589-11600

- 12414-12427
- [107] Jiang K, Lim J, Sgrizzi S, et al. Programmable RNA-guided DNA endonucleases are widespread in eukaryotes and their viruses. *Sci Adv*, 2023, 9(39): eadk0171
- [108] Awan MJA, Awan MRA, Amin I, et al. Fanzor: A compact programmable RNA-guided endonuclease from eukaryotes. *Trends Biotechnol*, 2023, 41(11): 1332-1334
- [109] Wang JY, Pausch P, Doudna JA. Structural biology of CRISPR-Cas immunity and genome editing enzymes. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20(11): 641-656
- [110] Nakagawa R, Hirano H, Omura SN, et al. Cryo-EM structure of the transposon-associated TnpB enzyme. *Nature*, 2023, 616(7956): 390-397
- [111] Sasnauskas G, Tamulaitiene G, Druteika G, et al. TnpB structure reveals minimal functional core of Cas12 nuclease family. *Nature*, 2023, 616(7956): 384-389