

題目： Vaccinia virus E3 prevents sensing of Z-RNA to block ZBP1-dependent necroptosis

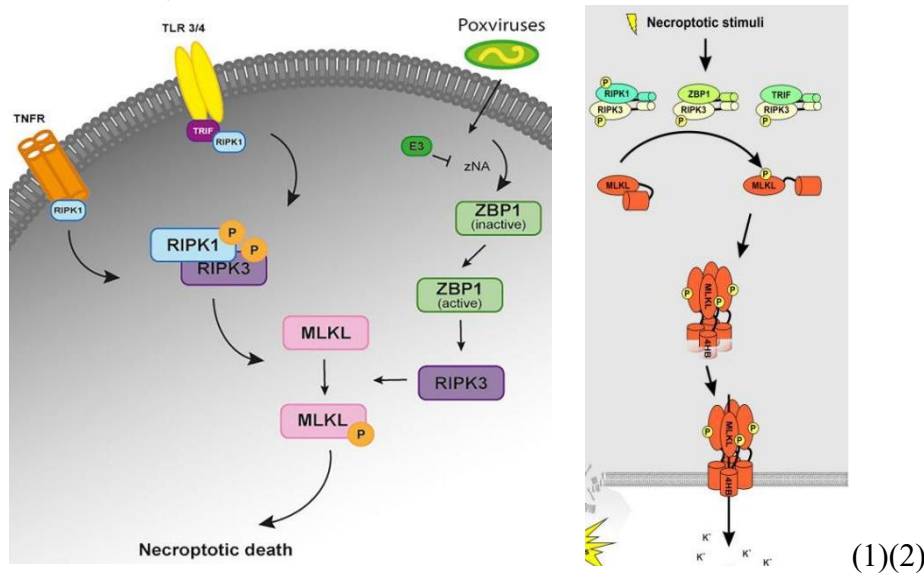
牛痘病毒的 E3 蛋白抑制 ZBP1 偵測左旋 RNA 抑制 ZBP1 依賴型的壞死性凋亡。

作者： Heather Koehler, Samantha Cotsmire, Ting Zhang, Siddharth Balachandran, Jason W Upton, Jeffery Langland, Daniel Kalman, Bertram L Jacobs, Edward S Mocarski

期刊： *Cell Host Microbe*. 29: 1266-1276.e5, 2021

介紹： 壞死性凋亡是宿主對抗病毒重要的防禦機制，讓被病毒感染的細胞死亡，抑制病毒的複製。

Z-nucleic-acid-binding protein 1 (ZBP1) 偵測到左旋核酸後，活化 RIPK3，接著募集 Mixed lineage kinase domain-like (MLKL) 到膜上，在細胞膜上打洞，細胞脹破，造成壞死性凋亡。VACV 的 E3 蛋白由 N 末端的 Z α domain 和 C 末端的 dsRNA binding domain 所構成，Z α domain 結合左旋核酸，dsRBD 結合右旋 RNA。本篇研究目的要探討 E3 蛋白如何抑制牛痘誘導的壞死性凋亡的詳細機制。

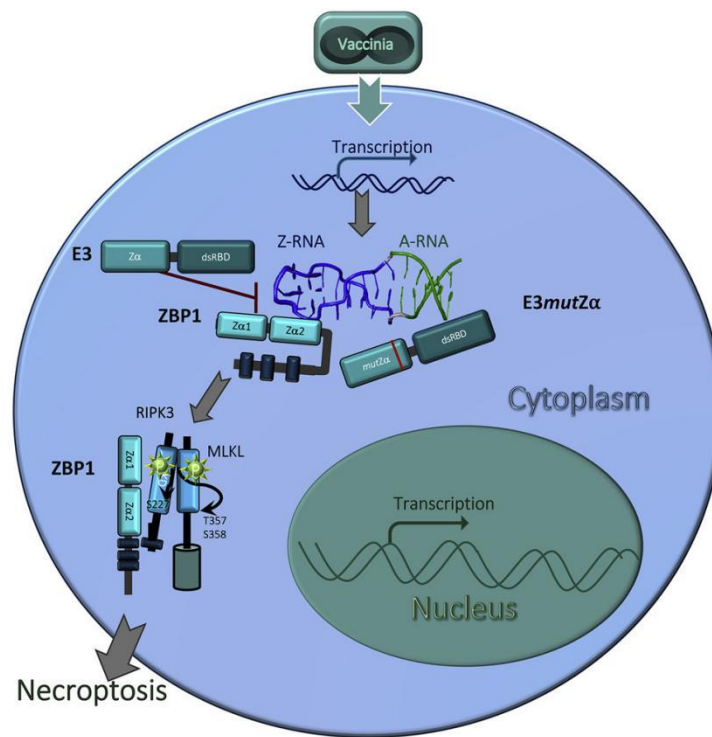


圖一、壞死性凋亡路徑

方法： 作者利用 plaque reduction assay、cell viability assay 和西方墨點法確定 L929 和 SVEC4-10 細胞在 E3 mutant 或 WT VACV 感染期間對壞死性凋亡的敏感性。為了調查 ZBP1 的哪個 domain 調控壞死性凋亡，用 Z α 缺陷的 E3 Δ 83N VACV 感染表達 ZBP1 Z α 1 和 Z α 2 mutant 的細胞，評估磷酸化 MLK 的表達和細胞活力。為了確定觸發壞死性凋亡所需的病毒複製步驟，作者使用抑制劑來阻斷 VACV 複製的各個階段。接下來，作者以免疫螢光分析確定感染 VACV 後，是否積累左旋核酸，接著以 Dnase I 和 RNase A 進一步確定為哪種核酸。此外，作者使用免疫沉澱來了解 E3 isomers 如何影響細胞質 RNA 與 ZBP1 的蛋白質間交互作用。

結果： VACV 轉錄過程中，Z-RNA 累積在被 VACV 感染的細胞。E3 N 末端 Z α domain 透過與 Z-RNA 競爭 ZBP1 Z α 2 來抑制 VACV 誘導的壞死性凋亡。另一方面，當 SVEC 細胞感染 Z α 缺陷的 E3 VACV 時，結果表明 Z α 缺陷型 E3 和 ZBP1 之間存在 RNA bridge。特別的是，E3 缺陷型 VACV 能夠抵抗壞死性凋亡，因此必須保留 E3 dsRBD 才能使 E3 Z α 缺陷型病毒觸發壞死性凋亡。因此，VACV E3 Z α 和 dsRBD 共同調控壞死性凋亡。

結論： 感染 WT VACV 時，VACV 在轉錄時產生左旋的 RNA，而 VACV 的 E3 蛋白與宿主的 ZBP1 共同競爭左旋 RNA，進而抑制 ZBP1 誘導的壞死性凋亡。另一方面，當感染 E3 Z α mut 的 VACV 時，ZBP1 順利的誘導壞死性凋亡。其中作者發現 E3 Z α mut 的 p20 與 ZBP1 之間存在 RNA bridge。整體來說，作者認為 E3 蛋白的 dsRBD 促進 pathogen-associated molecular patterns (PAMP) 的形成，而 Z α domain 則抑制 ZBP1 的活性。



討論：

1. 核酸常見的形式是 A form 右旋，轉變成 Z form 左旋的原因，可能為感染痘病毒後，產生氧化壓力，加上 OH 官能基後，翻轉成 Z form 左旋。(3)
2. 感染 A 型流感病毒、西尼羅河病毒、茲卡病毒後，也能觸發 ZBP1 調控的壞死性凋亡。但有些 DNA 病毒必須先將會抑制 ZBP1 或 RIPK3 的基因突變後，才能觸發壞死性凋亡。(4)
3. 感染 A 型流感後，觸發 ZBP1 -RIPK3-MLKL 的壞死性凋亡，而 MLKL 還會活化嗜中性球，增加發炎。有研究指出以 A 型流感病毒感染 MLKL 缺陷的小鼠後，能減少小鼠肺部上皮細胞的破壞，和減少嗜中性球募集到肺部，並且增加小鼠存活率(5)。因此我認為壞死性凋亡的好處是當病毒抑制凋亡的蛋白像是 caspase 的話，宿主有機會以壞死性凋亡的方式把被病毒感染的細胞清除掉，但壞處可能是增加發炎，嚴重一點可能會破壞組織等。
4. 腦炎是 VACV 疫苗罕見但嚴重的併發症，有研究發現利用 WT 和 E3 N 端截斷的牛痘以 intral nasal 感染後，發現 E3 N 端截斷的牛痘只會在鼻腔複製，不會擴散到腦部，減少 neuropathogenesis。因此 E3 N 端截斷的 VACV 未來可作為減毒疫苗或載體使用。(6)

參考：

1. Ana Águeda-Pinto et al., Convergent Loss of the Necroptosis Pathway in Disparate Mammalian Lineages Shapes Viruses Countermeasures *Front. Immunol.* 12:747737, 2021
2. Benedikt Kolbrink et al., Plasma Membrane Pores Drive Inflammatory Cell Death *Front. Cell Dev. Biol.* 8: 817, 2020
3. Zhan, Y. et al., Localized control of oxidized RNA *J. Cell Sci.* 128: 4210, 2015
4. Min Zheng et al., The regulation of the ZBP1-NLRP3 inflammasome and its implications in pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis) *Immunol. Rev.* 297: 26, 2020
5. Ting Zhang et al., Influenza Virus Z-RNAs Induce ZBP1-Mediated Necroptosis *Cell* 180 :1115, 2020
6. Teresa Brandt et al., The N-terminal domain of the vaccinia virus E3L-protein is required for neurovirulence, but not induction of a protective immune response *Virology* 333: 263, 2005