

分类号：

密级：



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

博士学位论文

DOCTOR'S DEGREE DISSERTATION

狂犬病病毒基质蛋白挟持自噬小体
帮助病毒出芽的机制研究

The matrix protein of rabies virus hijacks autophagosome
to facilitate efficient virus budding

研究生：袁悦铭
CANDIDATE: YUAN YUEMING

学 号：
STUDENT 2019302010079
NO.:

专 业：预防兽医学
MAJOR: PREVENTIVE VETERINARY
MEDICINE

导 师：赵 凌 教授
SUPERVISOR PROFESSOR ZHAO LING

中国 武汉
WUHAN, CHINA
二〇二四年六月
JUNE, 2024

华中农业大学博士学位论文

狂犬病病毒基质蛋白挟持自噬小体帮助病毒出芽
的机制研究

**The matrix protein of rabies virus hijacks autophagosome
to facilitate efficient virus budding**

博士研究生：袁悦铭

学 号：2019302010079

指导教师：赵 凌 教 授

指导小组：傅振芳 教 授

彭贵青 教 授

曹 罡 教 授

崔 旻 教 授

周 明 副 教 授

专业：预防兽医学

研究方向：动物病毒学

获得学位名称：农学博士

获得学位时间：2024 年 6 月

华中农业大学动物医学院

二〇二四年六月

本课题由

国家重点研发计划
(2022YFD1800100)

项目资助

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 狂犬病病毒简介	1
1.1.1 狂犬病病毒分类及其宿主	1
1.1.2 狂犬病病毒病原学	2
1.1.3 狂犬病病毒的生命周期	5
1.1.4 狂犬病病毒的入侵和扩散	6
1.2 自噬	7
1.2.1 自噬简介及分类	7
1.2.2 自噬发生步骤	8
1.2.3 自噬调控病毒生命周期的简介与分类	14
1.3 Nedd4 简介	19
1.3.1 Nedd4 的功能	19
1.4 Myo1c 简介	22
1.5 研究目的与意义	23
第二章 材料与方法	24
2.1 实验材料	24
2.1.1 细胞、毒株、质粒和感受态菌种	24
2.1.2 实验试剂、抗体和动物	24
2.1.3 实验仪器	26
2.2 实验方法	27
2.2.1 感染性克隆空质粒的构建	27
2.2.2 细胞的复苏与传代	27
2.2.3 重组 RABV 的拯救	28
2.2.4 重组 RABV 的扩大	28
2.2.5 病毒的滴度测定	29
2.2.6 Western blot	30
2.2.7 间接免疫荧光	30
2.2.8 透射电子显微镜观察类病毒颗粒(VLP)或病毒	31
2.2.9 免疫共沉淀	31
2.2.10 GST pull-down	32
2.2.11 siRNA	32
2.2.12 荧光定量 PCR	33
2.2.13 狂犬病病毒 VLP 的纯化和验证	34
2.2.14 病毒的多步生长曲线测定	34

2.2.15 小鼠攻毒实验.....	34
2.2.16 小鼠脑切片制作.....	35
2.2.17 免疫组化.....	35
2.2.18 HE 染色	35
2.2.19 小鼠脑组织 c DNA 的获取	36
2.2.20 数据分析.....	36
第三章 结果.....	37
3.1 狂犬病病毒的感染引起细胞 LC3-II 水平升高	37
3.2 狂犬病病毒的感染引起 GFP-LC3 点状聚集.....	37
3.3 狂犬病病毒的感染引起内源性 LC3 的点状聚集	38
3.4 狂犬病病毒的感染引起自噬小体的累积	38
3.5 狂犬病病毒的复制受到细胞自噬水平的调控	39
3.6 狂犬病病毒的 M 蛋白和 P 蛋白均可以引起自噬	40
3.7 M 蛋白引起细胞中自噬小体的累积.....	41
3.8 M 蛋白可以在 SK-N-SH 细胞中引起自噬	41
3.9 M 蛋白与 LC3 存在互作且互作水平与 M 蛋白的泛素化相关.....	42
3.10 无法被泛素化的突变 M 蛋白引起自噬的水平降低.....	44
3.11 Nedd4 与 M 蛋白直接互作并可以泛素化 M 蛋白.....	46
3.12 Nedd4 调控 M 蛋白或狂犬病病毒感染引起的自噬	48
3.13 不与 Nedd4 互作的 M 突变蛋白无法引起自噬	49
3.14 Nedd4 调控 M 与 LC3 的互作	51
3.15 Nedd4 在 M 蛋白存在时结合内源性 LC3 的能力增强.....	51
3.16 鼠源 Nedd4 的第 2 个 LIR 基序可以结合内源性 LC3.....	52
3.17 鼠源 Nedd4 的第 2、3 个 LIR 基序均可以在 M 蛋白的存在 下结合 LC3.....	53
3.18 LIR 基序突变的 Nedd4 介导 M 引起自噬的能力减弱.....	54
3.19 M 蛋白及狂犬病病毒感染引起的自噬均为不完全自噬.....	55
3.20 M 蛋白刺激产生的自噬体不会被溶酶体降解.....	57
3.21 M 蛋白引起的细胞自噬流不完整	57
3.22 M 蛋白阻止自噬小体与溶酶体的融合	58
3.23 M 蛋白与 Myo1c 存在互作.....	59
3.24 Myo1c 参与调控自噬	60
3.25 Myo1c 的过表达可回复 M 蛋白对细胞自噬的影响	61
3.26 M 蛋白可以破坏细胞 F-actin 的网络结构	61
3.27 M 蛋白阻碍 Myo1c 与内源性 actin 的结合.....	62
3.28 M 蛋白引起的自噬可以增加狂犬病病毒 VLP 的产出	63
3.29 M 蛋白引起的自噬可以增加狂犬病病毒 VLP 的出芽	64
3.30 M 蛋白引起的自噬促进狂犬病病毒 VLP 向细胞膜迁移的能力	

.....	64
3.31 抑制 M 蛋白引起的自噬可以降低狂犬病病毒 VLP 的产出效率	65
.....	65
3.32 抑制 M 蛋白引起的自噬可以降低狂犬病病毒的复制速率.....	66
3.33 重组狂犬病病毒 r RABV-M-APx Y 的扩散速率下降	67
3.34 重组狂犬病病毒 r RABV-M-APx Y 的复制速率下降	68
3.35 重组狂犬病病毒 r RABV-M-APx Y 引起自噬的水平下降	68
3.36 重组狂犬病病毒 r RABV-M-APx Y 的致病性降低	69
3.37 重组狂犬病病毒 r RABV-M-APx Y 在小鼠脑内的病毒载量下降	70
3.38 重组狂犬病病毒 r RABV-M-APx Y 在 小鼠脑内造成的病理变化较少	72
3.39 不同 丽沙病毒 M 蛋白的 PPx Y 结构域和可泛素化位点均保守	73
3.40 丽沙病毒的 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白均可引起自噬 ...	73
3.41 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白均引起不完全自噬	74
3.42 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白与 Nedd4 及 LC3 互作.....	76
3.43 Nedd4 介导着 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白与 LC3 的互作	76
3.44 Nedd4 调控 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白引起的自噬	77
第四章 讨论.....	79
4.1 狂犬病病毒的出芽机制.....	79
4.2 狂犬病病毒基质蛋白促进自噬的条件	79
4.3 狂犬病病毒基质蛋白阻止完全自噬发生的条件	81
4.4 狂犬病病毒基质蛋白通过自噬调控病毒出芽	81
第五章 结论.....	83
参考文献.....	84

摘 要

丽沙病毒属 (Lyssavirus) 的病毒均可引起致命的人兽共患病。据世界卫生组织 WHO 统计, 其属内的狂犬病病毒 (Rabies virus, RABV) 每年在全球导致约 59000 人死亡, 我国是狂犬病高发国家之一。狂犬病病毒具有神经嗜性且可在中枢神经系统中进行大量复制导致宿主死亡, 目前对于狂犬病病毒在中枢神经系统中的生命周期, 尤其是病毒的出芽机制方面尚不清楚。

有研究表明狂犬病病毒的基质蛋白 M 中均存在一个保守的 PPxY 基序, 其是病毒出芽的必要条件, 但 PPxY 基序影响病毒出芽的机制仍不明晰。在本研究中, 我们以丽沙病毒属的代表 RABV 为研究对象, 深入解析了 RABV 与部分其他丽沙病毒 M 蛋白的 PPxY 基序影响病毒出芽的机制。主要取得了如下结果:

首先使用激光共聚焦和免疫印迹实验确认 RABV 的感染可以引起细胞自噬, 并进一步对 RABV 各个结构蛋白对自噬的影响进行分析, 发现 RABV 的 P 蛋白和 M 蛋白均可以引起自噬发生。通过免疫共沉淀实验确定了 RABV 的 M 蛋白 (RABV-M) 通过其 PPxY 基序与 E3 泛素连接酶 Nedd4 发生互作, 且 M 蛋白的第 60 位氨基酸赖氨酸 (K) 可以被 Nedd4 进行泛素化修饰。同时, 在与泛素化的 RABV-M 结合后, Nedd4 可以暴露出更多的 LC3 互作区域来结合 LC3, 从而使得 RABV-M 对自噬的诱导能力增强。

我们进一步通过激光共聚焦和免疫印迹实验发现 RABV-M 可以阻止自噬体与溶酶体的融合。为了阐明该机制, 我们利用质谱鉴定出 Myo1c 可以与 RABV-M 互作, 免疫共沉淀实验证明 RABV-M 可以通过和 Myo1c 互作来竞争性抑制 Myo1c 与骨架蛋白的互作, Myo1c 与骨架蛋白的互作被扰乱会导致细胞骨架网络的破坏, 最终使得自噬体无法和溶酶体融合。为了阐明 RABV-M 引起的不完全自噬与病毒生命周期间的关系, 通过激光共聚焦、透射电镜与免疫印迹实验证明了 RABV-M 引起的不完全自噬有利于 RABV 的类病毒颗粒的出芽。此外, 我们进一步构建和拯救了重组狂犬病病毒 rRABV-M-APxY, 该病毒中的 M 蛋白被替换为无法引起自噬的突变 M 蛋白。通过激光共聚焦等实验证明了该重组病毒引起自噬的水平和出芽的效率均与亲本毒株 rRABV 相比发生显著的

下降，该重组病毒的复制速率和对小鼠的致病性相较于亲本株也发生了显著的降低。

丽沙病毒属的病毒的基质蛋白 M 的氨基酸序列极为保守，为了研究上述机制是否适用于丽沙病毒属的其他病毒，我们进一步对澳大利亚蝙蝠丽沙病毒的 M 蛋白（ABLV-M）和欧洲蝙蝠丽沙病毒 1 型的 M 蛋白（EBLV-M）引起自噬发生的机制进行了实验并证明 ABLV-M 和 EBLV-M 均通过与 Nedd4 互作来引起细胞自噬，这与 RABV-M 引起自噬的机制相一致。

总之，我们的研究发现了具有 PPxY 基序的狂犬病病毒可以利用宿主的自噬系统来实现高效的病毒出芽，该机制的发现将为抗狂犬病病毒的药物研发奠定基础，并为针对具有 PPxY 基序的病毒的出芽机制研究提供借鉴。

关键词：狂犬病病毒；丽沙病毒；基质蛋白；自噬；Nedd4；Myo1c；F-actin；病毒出芽

Abstract

All viruses in the genus *Lyssavirus* can cause highly fatal zoonotic diseases. According to the World Health Organization (WHO), its sister virus, rabies virus (RABV), causes approximately 59,000 human deaths worldwide each year, and China is one of the countries with a high incidence of rabies. RABV is neurotropic and can replicate rapidly in the brain to destroy the host central nervous system. To date, our understanding of the life cycle of RABV in the brain is still incomplete, particularly the viral egress process in neurons. So, it is important to study the life cycle of RABV in neuronal cells to provide a theoretical basis for the development of anti-RABV drugs.

It has been shown that a conserved PPxY motif exists in *Rhabdovirus*. Researchers have found that the PPxY motif is necessary for virus budding, but studies on the mechanism of how the PPxY motif affects virus budding are still incomplete. In this study, we investigated the mechanism by which the PPxY motif of RABV matrix protein affects viral egress, and verified the mechanism on some M proteins of lyssaviruses.

First, we confirmed that RABV infection can induce cellular autophagy using confocal and immunoblotting (WB), and then we analyzed the effect of each structural protein of RABV on autophagy, and we found that both P and M protein of RABV can induce autophagy. Since the mechanism of autophagy induced by RABV P protein has been well studied, we chose RABV M protein for the follow-up study. Using co-immunoprecipitation, we found that the PPxY motif of RABV-M could interact with the E3 ubiquitin ligase Nedd4 and that amino acid 60 on RABV-M could be ubiquitinated by Nedd4. We also found that after binding to ubiquitinated RABV-M, Nedd4 could expose more LC3 interacting region (LIR motif) to bind LC3, which led to enhanced induction of autophagy by RABV-M.

We then found that RABV-M could prevent the fusion of autophagosomes with lysosomes by using confocal analysis and WB. To elucidate this mechanism, we used mass spectrometry to analyze the RABV-M-interacting proteins, we identified Myo1c

that can interact with RABV-M, and found that RABV-M could competitively inhibit the interaction of Myo1c with skeletal proteins by interacting with Myo1c, and that disruption of the interaction of Myo1c with skeletal proteins would lead to the disruption of the F-actin network. Ultimately, this prevents autophagosomes from fusing with lysosomes. To elucidate the relationship between RABV-M-induced incomplete autophagy and the RABV life cycle, we used confocal, transmission electron microscopy, and WB experiments to demonstrate that RABV-M-induced incomplete autophagy facilitates the budding of RABV VLPs. To validate these mechanisms, we identified at the viral level, we constructed a recombinant rabies virus with the M protein replaced by a point mutant M protein that does not induce autophagy, named rRABV-M-APxY. Our further experiments demonstrated that the recombinant virus induced a significant decrease in the level of autophagy and the efficiency of budding compared to the parental strain rRABV. The replication rate and pathogenicity of the recombinant virus rRABV-M-APxY in mice were also significantly reduced.

To extend the mechanism of RABV-M on autophagy induction to all lyssaviruses, we selected the M protein of Australian bat lyssavirus (ABLV-M) and European bat lyssavirus type 1 (EBLV-M) after confirming that lyssavirus M proteins share the conserved PPxY motif and ubiquitination sites. We found that both ABLV-M and EBLV-M interact with Nedd4 to induce cellular autophagy, which is consistent with our findings for RABV-M. In conclusion, our study revealed an interesting and novel mechanism by which RABV achieve efficient virus budding by exploiting the host autophagy system, and this mechanism has important implications for the development of potent drugs against these deadly viruses.

Keywords: Rabies virus; Lyssavirus; Matrix protein; Autophagy; Nedd4; Myo1c; F-actin; Viral budding

缩略语表 (Abbreviation)

英文缩写	英文全称	中文全称
ABLV	Australian bat lyssavirus	澳大利亚蝙蝠丽沙病毒
ATG	autophagy-related gene	自噬相关基因
ARAV	Aravan virus	Aravan 丽沙病毒
aa	Amino acid	氨基酸
BBLV	Bokeloh bat lyssavirus	Bokeloh 蝙蝠丽沙病毒
CNS	Central nervous system	中枢神经系统
CVS	Challenge virus standard	标准攻毒株
DUVV	Duvenhage virus	Duvenhage 丽沙病毒
DENV	Dengue virus	登革热病毒
DEPC	Diethypyrocarbonate	焦磷酸二乙酯
DMEM	Dulbecco's modified egle's medium	DMEM 培养基
EBLV-1	European bat lyssavirus 1	欧洲蝙蝠 1 型丽沙病毒
EBLV-2	European bat lyssavirus 2	欧洲蝙蝠 2 型丽沙病毒
EBV	Epstein-Barr virus	EB 病毒
EBOV	Ebloa virus	埃博拉病毒
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport	运输所需的核内体分拣复合体
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FFU	Fluorescence focus units	荧光病毒灶单位
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	三磷酸甘油醛脱氢酶
GBLV	Gannoruwa bat lyssavirus	Gannoruwa 蝙蝠丽沙病毒
GRB10	Growth factor receptor-bound protein 10	生长因子受体结合蛋白 10
G	Glycoprotein	糖蛋白
g	Gravity unit	重力单位

英文缩写	英文全称	中文全称
g/mg/μg	Gram/milligram/microgram	克/毫克/微克
HBV	Hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HHV-8	Human herpesvirus-8	人类疱疹病毒 8 型
HSV-1	Herpes simplex virus type 1	单纯疱疹病毒 1 型
HCMV	Human cytomegalovirus	人类巨细胞病毒
HPIV3	Human Parainfluenza virus type 3	人副流感病毒 3 型
IAV	Influenza A virus	甲型流感病毒
IFN	Interferon	干扰素
IGF1R	Insulin Like Growth Factor 1 Receptor	胰岛素样生长因子 1 受体
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IFN	Interferon	干扰素
IKOV	Ikoma lyssavirus	Ikoma 丽沙病毒
IRKV	Irkut virus	Irkut 丽沙病毒
L/mL/μL	Liter/milliliter/microliter	升/毫升/微升
LAMP1	Lysosomal associated membrane protein 1	溶酶体关联膜蛋白 1
LAPTM5	Lysosomal-associated protein transmembrane 5	溶酶体相关跨膜蛋白 5
LBV	Lagos bat virus	Lagos 蝙蝠丽沙病毒
LLEBV	Lleida bat lyssavirus	Lleida 蝙蝠丽沙病毒
M	Matrix protein	基质蛋白
M/mM/μM	Mole/millimole/micromole	摩尔/毫摩尔/微摩尔
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling protein	线粒体抗病毒信号蛋白
MOKV	Mokola virus	莫科拉丽沙病毒
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
mGluR2	Metabotropic glutamate receptor	代谢型谷氨酸受体亚型 2

英文缩写	英文全称	中文全称
	subtype 2	
MVB	Multivesicular body	多泡体
Myo1c	Myosin IC	肌球蛋白 1c
N	Nucleprotein	核蛋白
nAChR	Acetylcholine receptor subunit alpha	α 亚型乙酰胆碱受体
NB	Negri body	内基氏小体
NCAM	Neural cell adhesion molecule	神经细胞粘附分子
Nedd4	Neuronally expressed developmentally downregulated 4	神经前体细胞表达的发育 下调蛋白 4
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B	核因子 κ B
pAb	Polyclonal antibody	多克隆抗体
P	Phosphoprotein	磷酸化蛋白
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern	病原体相关分子模式
p75NTR	P75 neurotrophin receptor	p75 神经营养因子受体
PAS	Pre-autophagosomal structure	自噬前体结构
PBS	Phosphate buffer (buffered) saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PI4P	Phosphatidylinositol-4-phosphate	磷脂酰肌醇-4-磷酸
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
PRR	Pattern recognition receptor	模式识别受体
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
qPCR	Quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
RABV	Rabies virus	狂犬病病毒
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA 依赖性 RNA 聚合酶
RIG-I	Cytoplasmic retinoic acid-inducible gene I	视黄酸诱导基因 I
RIPK1	Receptor-interacting protein kinase 1	受体相互作用丝氨酸苏氨酸 激酶 1
RNP	Ribonucleoprotein	核糖核蛋白体

英文缩写	英文全称	中文全称
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
RVFV	Rift Valley fever virus	裂谷热病毒
s/min/h	Second/minute/hour	秒/分/小时
SD	Standard deviation	标准差
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基磺酸钠-聚丙烯 酰胺凝胶电泳
SE	Standard error	标准误差
SHBRV	Silver-haired bat rabies virus	银发蝙蝠狂犬病毒
SHIBV	Shimoni bat virus	Shimoni 蝙蝠丽沙病毒
SINV	Sindbis virus	辛德比斯病毒
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor	可溶性 N-乙基马来酰亚 胺敏感因子附着蛋白受体
SG	Stress granule	应激颗粒
TBST	Tris Buffered saline Tween	洗膜缓冲液
TEM	Transmission electron microscope	透射电镜
TLR7	Toll Like Receptor 7	Toll 样受体 7
VSV	Vesicular stomatitis virus	水泡性口炎病毒
WB	Western blot	免疫印迹
WCBV	West Caucasian bat virus	西高加索蝙蝠丽沙病毒
WT	Wild type	野生型
ZIKV	Zika virus	寨卡病毒

第一章 文献综述

1.1 狂犬病病毒简介

1.1.1 狂犬病病毒分类及其宿主

引起狂犬病的病原体均属于弹状病毒科（Rhabdoviridae）的丽沙病毒属（Lyssavirus）。在所有的丽沙病毒中，研究最为深入的是狂犬病病毒 Rabies virus（RABV）。根据对现有的各种丽沙病毒在遗传构成，血清学交叉反应性和所引起病症的资料的差异的资料进行分析，研究者们认为丽沙病毒至少可以分为两个遗传谱系（Phylogroup）（图 1-1），其中遗传谱系 1 型包括 Aravan 丽沙病毒（ARAV），澳大利亚蝙蝠丽沙病毒（ABLV），Bokeloh 蝙蝠丽沙病毒（BBLV），Duvenhage 丽沙病毒（DUVV），欧洲蝙蝠 1 型丽沙病毒（EBLV-1），欧洲蝙蝠 2 型丽沙病毒（EBLV-2），Irkut 丽沙病毒（IRKV），Khujand 丽沙病毒（KHUV），以及狂犬病病毒 RABV。遗传谱系 2 型包括 Lagos 蝙蝠丽沙病毒（LBV），莫科拉丽沙病毒（MOKV），以及 Shimoni 蝙蝠丽沙病毒（SHIBV）。另有某些病毒由于研究资料的不足未被分类，比如 Ikoma 丽沙病毒（IKOV），西高加索蝙蝠丽沙病毒（WCBV），Lleida 蝙蝠丽沙病毒（LLEBV），以及 Gannoruwa 蝙蝠丽沙病毒（GBLV）(Fisher et al. 2018)。

Phylogroup	Species name	Abbreviation
Phylogroup I	Aravan lyssavirus	ARAV
	Australian bat lyssavirus	ABLV
	Bokeloh bat lyssavirus	BBLV
	Duvenhage lyssavirus	DUVV
	European bat 1 lyssavirus	EBLV-1
	European bat 2 lyssavirus	EBLV-2
	Irkut lyssavirus	IRKV
	Khujand lyssavirus	KHUV
	Rabies lyssavirus	RABV
Phylogroup II	Lagos bat lyssavirus	LBV
	Mokola lyssavirus	MOKV
	Shimoni bat lyssavirus	SHIBV
Unclassified	Ikoma lyssavirus	IKOV
	West Caucasian bat lyssavirus	WCBV
	Lleida bat lyssavirus	LLEBV
	Gannoruwa bat lyssavirus	GBLV

图 1-1 丽沙病毒分类 (Fisher et al. 2018)

Fig. 1-1 Classification of lyssavirus (Fisher et al. 2018)

大多数丽沙病毒的宿主均为蝙蝠，少数几种丽沙病毒比如 EBLV-1 和 EBLV-2 的贮存宿主的蝙蝠种类及其地理分布已经有了完善的记录，而更多种类的丽沙病毒的宿主信息则由于对应分离株的数量的稀缺而不够完善(Banyard et al. 2017)。针对 RABV 的记录是如此完善则是因为 RABV 的宿主主要是无法飞行的食肉动物（食谱中 50-70%为肉类的动物），比如狗、狐狸、浣熊、猫科动物和臭鼬(Fooks et al. 2014)，来源于这些动物的分离株易于被分离并记录。同样的，RABV 的蝙蝠类宿主因为分离株数量的稀缺而缺少记录。对于丽沙病毒属的所有病毒来说，其引起的人类等大型哺乳动物如牛和马的狂犬病均属于病毒跨物种传播或病毒溢出（病毒溢出即病毒可以感染新的物种）(Fooks et al. 2014)

1.1.2 狂犬病毒病原学

包括狂犬病病毒在内的丽沙病毒均为单股负链 RNA 病毒，其病毒粒子被来源于细胞的囊膜所包裹且整个病毒粒子呈子弹样结构，病毒粒子长约 200 纳米，宽约 80 纳米（图 1-2）。其 RNA 基因组的长度在 11000 个碱基左右，其基因共编码 5 个结构蛋白，分子量从大到小依次是：RNA 聚合酶蛋白（RNA polymerase, L），糖蛋白（Glycoprotein, G），核蛋白（Nucleoprotein, N），磷酸化蛋白（Phosphoprotein, P），以及基质蛋白（Matrix protein, M）。其中基质蛋白 M，糖蛋白 G 与囊膜一起组成病毒的衣壳。核蛋白 N，磷酸化蛋白 P 及 RNA 聚合酶蛋白 L 组成核糖核蛋白体（Ribonucleoprotein, RNP）(Blanchard 2004)。

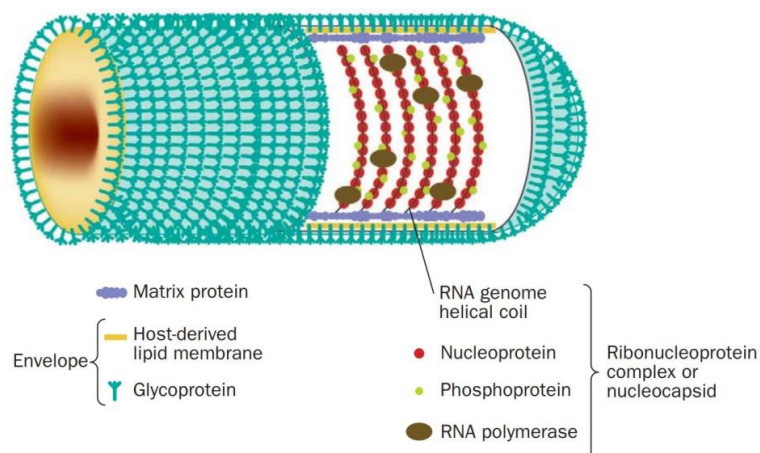


图 1-2 丽沙病毒的结构 (Blanchard, 2004)

Fig. 1-2 The structure of lyssavirus (Blanchard, 2004)

1.1.2.1 狂犬病病毒基质蛋白的生物学功能

狂犬病病毒的基质蛋白 M 由 202 个氨基酸组成，其在病毒的复制过程中发挥着多种功能。其中最为核心的功能就是促进狂犬病病毒的出芽(Okumura et al. 2011)。基质蛋白 M 上具有的 PPxY 结构域也被称为晚期出芽结构域，PPxY 结构域的突变会导致病毒的复制速率显著降低(Wirblich et al. 2008)。PPxY 结构域会使得基质蛋白 M 与宿主细胞中的含有 WW 结构域的 Nedd4 家族蛋白互作(Harty et al. 1999)，且 Nedd4 家族蛋白已被证明参与了某些病毒的结构蛋白泛素化或出芽(Harty et al. 1999; Taylor et al. 2007; Votteler et al. 2013; Wirblich et al. 2008)。有研究表明，弹状病毒的出芽并不依赖宿主蛋白 TSG101 和 VPS4A 这两个可以与基质蛋白 PPxY 结构域互作并参与囊泡运输的宿主蛋白(Irie et al. 2004)，暗示有其他蛋白参与了弹状病毒的出芽过程。

基质蛋白 M 同时也负责着桥接病毒衣壳与核衣壳来维持病毒粒子结构的稳定性，并通过促进病毒 RNP 聚合来调控病毒基因组的转录与复制速率(Komarova et al. 2007; Liu et al. 2021; Luo et al. 2019)。在先天性免疫上，有报道指出 RABV 的基质蛋白 M 可以与 RelAp43 互作来抑制 NF- κ B 通路的激活，并且也可以协同磷酸化蛋白 P 来促进病毒对 JAK-STAT 通路的抑制，RABV 街毒株的基质蛋白 M 还可以通过减少应激颗粒(stress granule, SG)的形成来降低 RIG-I 通路的激活，以上作用均会使得细胞的炎症通路和干扰素通路被抑制进而利于病毒复制(Ben Khalifa et al. 2016; Besson et al. 2017; Kojima et al. 2022; Sonthonnax et al. 2019)。亦有研究表明 RABV 的基质蛋白 M 在诱导 RABV 感染细胞所发生的自噬上发挥了作用，但其分子机制及对病毒复制的影响未被解析完全(Peng et al. 2016)。

1.1.2.2 狂犬病病毒核蛋白的生物学功能

狂犬病病毒的 N 蛋白由 450 个氨基酸组成，其中某些毒株的 N 蛋白由 451 个氨基酸组成。N 蛋白的氨基酸序列的保守性较高，其在病毒复制过程中发挥的主要功能即构建病毒复制的理想环境，N 蛋白通过与 P 蛋白的 C 端结构域结合形成内基氏小体的外壳(Nevers et al. 2022)。N 蛋白在病毒复制阶段可以作为

病毒基因组 RNA 的平台以保证病毒基因组 RNA 的顺利转录(Schoehn et al. 2001), 当 N 蛋白没有与病毒基因组 RNA 结合时, N 蛋白通过与 P 蛋白的 N 端结构域结合形成 N⁰-P 复合体来保证自身的可溶性(Albertini et al. 2011; Mavrakakis et al. 2006)。

1.1.2.3 狂犬病病毒磷酸化蛋白的生物学功能

狂犬病病毒的磷酸化蛋白 P 具有高度亲水性, 由 297 个氨基酸组成, 少部分会存在几个氨基酸的长度差异, P 蛋白在病毒的复制过程中发挥着多种功能。其中最为核心的功能有两个, 一是与 N 蛋白和 L 蛋白一起组装成病毒的复制工厂: 内基氏小体 (Negri body) 的外壳(Chenik et al. 1994)。内基氏小体是具有液-液相分离性质的亚细胞器结构, 其中 P 蛋白的超变区结构域和二聚化结构域对于内基氏小体的形成极为关键(Nikolic et al. 2017)。在内基氏小体中, 如果没有 P 蛋白去结合并稳定 L 蛋白的构象, L 蛋白则无法行使其 RNA 聚合酶功能(Jacob et al. 2001)。二是抑制宿主细胞中的先天性免疫反应。狂犬病病毒的 P 蛋白均有一定程度抑制 IFN 产生的能力, 先前有研究表明 RABV 的 P 蛋白的第 176-186 位氨基酸在抑制 RIG-I 通路激活上起到了关键作用(Brzózka et al. 2005; Rieder et al. 2011)。最近的研究则揭示了狂犬病病毒的 P 蛋白抑制 RIG-I 通路的主要原因在于其可以与 IKKe 结合阻断 RIG-I 下游通路的激活, 而不同狂犬病病毒 P 蛋白抑制 RIG-I 通路的强度不一致与 P 蛋白的第 179 位氨基酸有关(Wang et al. 2022)。

1.1.2.4 狂犬病病毒糖蛋白的生物学功能

狂犬病病毒的糖蛋白 G 是狂犬病病毒 5 个结构蛋白中研究最为深入的, 因为 G 蛋白是最重要的毒力蛋白, 其专职于细胞入侵但还具有其余功能如调控细胞免疫反应(Préhaud et al. 2003)。大部分丽沙病毒的 G 蛋白由 524 个氨基酸组成, 存在例外如 Mokola 丽沙病毒的 G 蛋白由 522 个氨基酸组成。狂犬病病毒的 G 蛋白以三聚体的形式存在于病毒囊膜之上, RABV-G 蛋白三聚体的结构已经通过冷冻电镜得到解析(Ng et al. 2022)。G 蛋白的三聚体结构与其侵入细胞所用细胞受体存在直接联系, 现在可以确认的 RABV 侵入细胞所使用的受体至少包括以下四种: α 亚型乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor subunit alpha,

nAChR/CHRNA1) (Lentz et al. 1983), 神经细胞粘附分子 (neural cell adhesion molecule, NCAM) (Thoulouze et al. 1998), p75 神经营养因子受体 (p75 neurotrophin receptor, p75NTR) (Tuffereau et al. 1998), 以及最新发现的代谢型谷氨酸受体亚型 2 (metabotropic glutamate receptor subtype 2, mGluR2) (Wang et al. 2018)。可以推测出狂犬病病毒 G 蛋白所使用的侵入细胞的受体也是多种类的。

1.1.2.5 狂犬病病毒聚合酶蛋白的生物学功能

狂犬病病毒的聚合酶蛋白 L 是狂犬病病毒 5 个结构蛋白中最大的, 由 2127 个碱基组成。L 蛋白结构核心由 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 结构域和拥有多核苷酸转移酶活性的盖状结构域构成。RNA 聚合酶蛋白顾名思义, 可在狂犬病病毒复制过程中对病毒基因组 RNA 进行转录及复制。并且 L 蛋白还可在病毒的转录本的 5' 端加帽来防止病毒转录本被降解。加帽的机制有两种, 一是利用 L 蛋白的内切酶功能从宿主细胞中已经加帽的 RNA 中偷取, 二是利用加帽酶和甲基转移酶从头合成帽子结构(Ogino et al. 2019)。另外, 除了直接参与 RNA 的复制与转录, L 蛋白还可能与病毒的致病性或者免疫原性有关, 比如研究者发现 RABV 的 L 蛋白的甲基转移酶区域的第 1685 位氨基酸和第 1829 位氨基酸与 RABV 对 1 型 IFN 的敏感性相关, 但是其详细机制还未被解析(Tian et al. 2016)。

1.1.3 狂犬病病毒的生命周期

狂犬病病毒的生长周期如图 1-3 所示(Fisher et al. 2018)。第一步, 狂犬病病毒通过其糖蛋白 G 与神经细胞表面的某些受体结合, 然后通过内吞作用进入细胞。第二步, 病毒囊膜与细胞内体膜相融合并将病毒基因组释放入胞浆中。第三步, 病毒 RNA 被病毒 RNP 识别并转录, 首先转录出短的不加帽的 leader RNA, 再转录出 5'端加帽, 3'端加 poly A 尾的长的 mRNA。第四步, 长的 mRNA 依此翻译出病毒的核蛋白 N, 磷酸化蛋白 P, 基质蛋白 M, 糖蛋白 G 以及聚合酶蛋白 L。第五步, 病毒 RNP 对病毒 RNA 进行复制生成互补的正义 RNA, 正义 RNA 被作为模板再复制出病毒 RNA。第六步, 病毒 RNA 及病毒蛋白被组装成病毒粒子并出芽开始新一轮的感染。

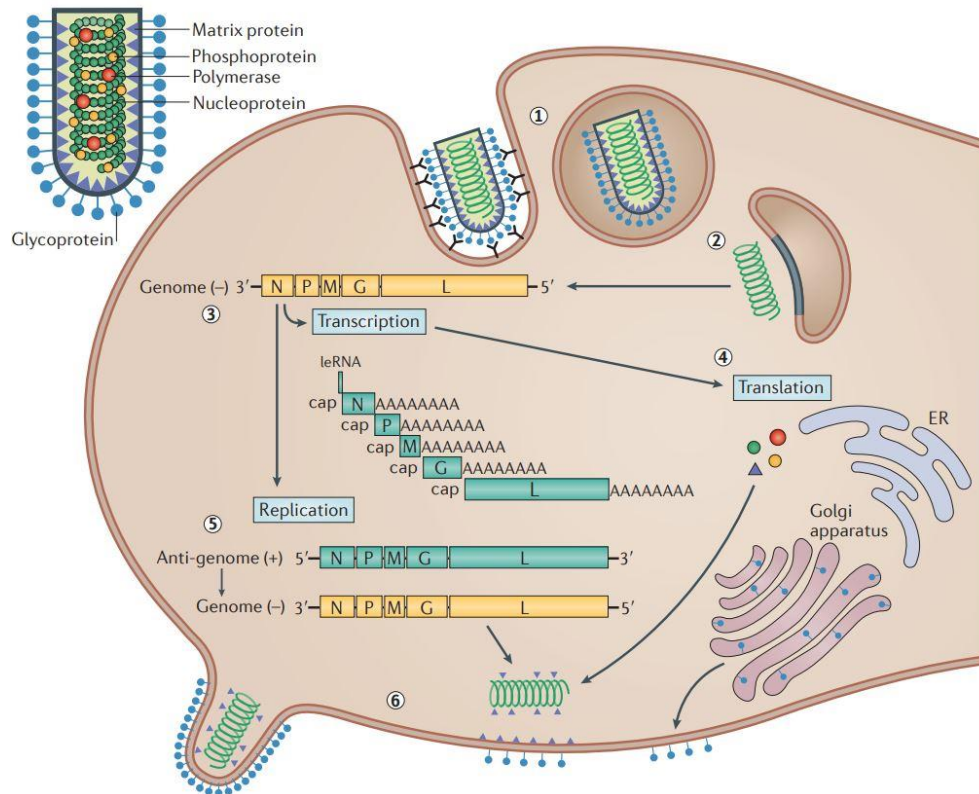


图 1-3 狂犬病病毒的复制周期 (Fisher et al. 2018)

Fig. 1-3 Rabies virus life cycle (Fisher et al. 2018)

1.1.4 狂犬病病毒的入侵和扩散

狂犬病病毒感染宿主的最主要的方式是通过被感染动物的撕咬或舔舐行为，即含有病毒粒子的唾液与宿主的开放性创口相接触。在绝大部分情况下，狂犬病病毒会首先接触到宿主的肌肉组织（图 1-4）(Scott et al. 2021)，已有证据表明 RABV 在肌肉细胞中会少量的复制并通过烟碱样乙酰胆碱受体进行细胞间的扩散(Lafon 2005)，这样的感染会使得病毒在肌肉组织中停留较长时间(Charlton et al. 1997)，并最终在病毒感染神经肌肉接头处的运动终板后开始进行病毒的逆向神经运输。在少部分情况下，过深的创口会使得狂犬病病毒直接接触到神经组织，这会使得病程显著缩短。RABV 从外周神经系统（peripheral nervous system, PNS）到中枢神经系统（central nervous system, CNS）的逆向轴突运输是微管依赖性的(Lycke et al. 1987; Tsiang et al. 1991)，RABV 的 M 蛋白可能参与调节微管蛋白的聚合并促进自身在神经细胞中的复制(Zan et al. 2017)。

RABV 在逆轴突运输过程中需要 p75 神经营养因子受体（p75NTR）来加快它的移动速度，p75NTR 的存在可以使得 RABV 更快的进入 CNS(Gluska et al.

2014)。RABV 的聚合酶蛋白 L 也可能参与并加快了 RABV 的逆向运输效率 (Bauer et al. 2015)。RABV 利用其在细胞轴突上的逆向运输及跨突触运输抵达 CNS(Kelly et al. 2000; Ugolini 2011)。在 RABV 抵达 CNS 后会利用谷氨酸受体 2 型这种在整个 CNS 中丰度极高的受体来继续进行逆向运输并抵达脑干然后扩散至其余脑组织(Wang et al. 2018)。在脑组织中的 RABV 会进行大量的扩增, 之后 RABV 会沿着终端轴突顺向扩散到唾液腺(Charlton et al. 1983)。RABV 将在唾液腺中继续复制并随着唾液感染下一个宿主, 此时的宿主的非神经性细胞及器官都可能存在 RABV(Potratz et al. 2020)。

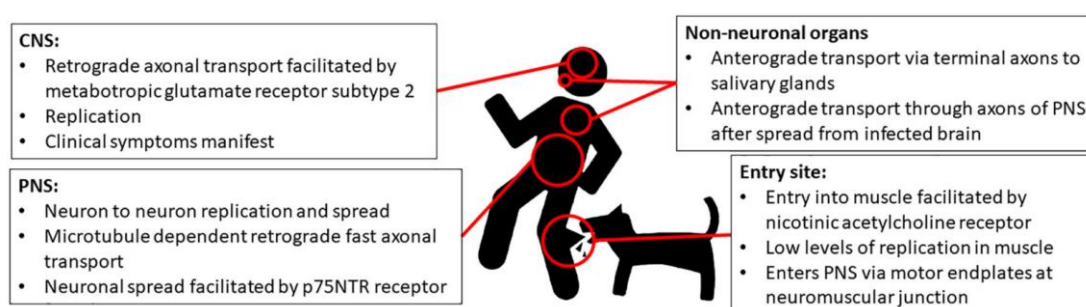


图 1-4 狂犬病病毒的入侵和扩散 (Scott and Nel. 2021)

Fig. 1-4 The invasion and spread of RABV (Scott and Nel. 2021)

1.2 自噬

1.2.1 自噬简介及分类

自噬是真核细胞中一个保守的降解蛋白质的生理过程, 在维持细胞稳态方面发挥着不可或缺的作用(Antonioli et al. 2017; Gatica et al. 2018)。在过去几十年的研究中, 研究者们已经确定自噬与先天性免疫反应、炎症反应和神经退行性变化间存在紧密关联(Cadwell 2016; Clarke et al. 2019; Deretic et al. 2013; Menzies et al. 2017; Paludan et al. 2021)。

真核细胞中的自噬可以分为巨自噬和微自噬, 巨自噬于 20 世纪 60 年代在哺乳动物细胞中被首次发现, 对其进行深入研究则是在 20 世纪 90 年代于酵母中观察到巨自噬现象之后。科学家在酵母中鉴定出了一系列重要的自噬相关基因 (autophagy-related gene, ATG), 推动了该领域的快速发展(Nakatogawa 2020)。微自噬于 20 世纪 80 年代被首次发现并于 90 年代开始进行研究(Schuck 2020)。如图 1-5 所示, 在巨自噬过程中, 自噬体负责将需要降解的蛋白运送至

溶酶体然后降解。而在微自噬过程中，细胞组分直接被溶酶体降解。现有研究基本集中于巨自噬，这可能与巨自噬现象的尺度更易于被显微镜观测到有关，而针对微自噬的研究于近些年来成像系统的极限分辨率的愈发缩小化才得到较为细致的研究。因此在研究中若无特殊说明，自噬指代的均为巨自噬。自噬是真核细胞中一个保守的降解蛋白质的生理过程，在维持细胞稳态方面发挥着不可或缺的作用（Antonioli, Di Rienzo et al., 2017, Gatica, Lahiri et al., 2018）。

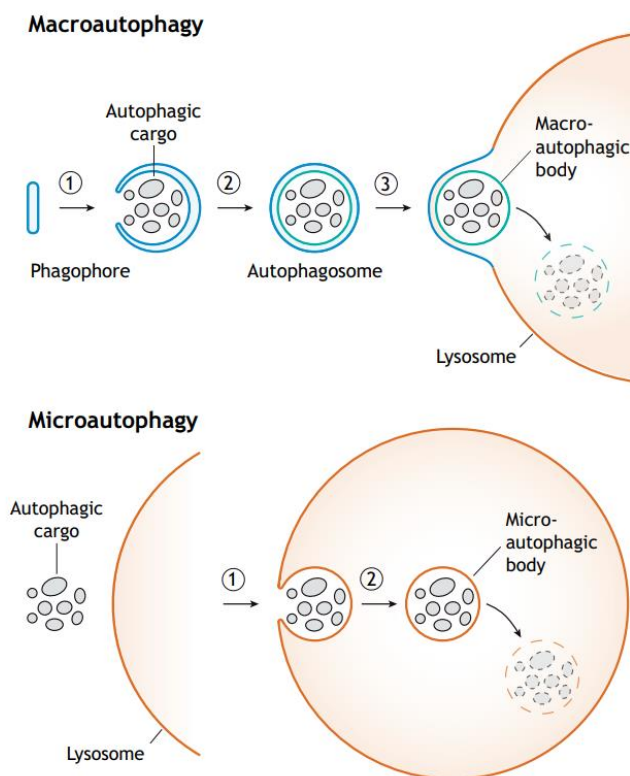


图 1-5 巨自噬与微自噬 (Schuck. 2020)

Fig. 1-5 Macroautophagy and microautophagy (Schuck. 2020)

1.2.2 自噬发生步骤

1.2.2.1 自噬起始

自噬发生的核心部件是 ULK 复合物，其由支架蛋白 FIP200、ATG13、ATG101 和丝氨酸/苏氨酸激酶 ULK1 或 ULK2 组成。它的活性主要被雷帕霉素复合物 1 (mTORC1) 抑制。在饥饿（细胞营养匮乏）的条件下，mTORC1 会失活然后导致内质网膜附近的 ULK 复合物组装并激活，ULK 复合物接着招募下游的 ATG 蛋白以启动自噬体的形成（图 1-6）。在酵母细胞中，与 ULK1/ULK2 同源的 Atg1 复合物会形成类似 ULK 复合物的结构，该结构被称

为自噬前体结构（pre-autophagosomal structure, PAS）。PAS 的结构复杂程度高于 Atg1 复合物，其中 Atg13 将 Atg1 复合物与 Atg17-Atg29-Atg31 亚复合物连接在一起(Fujioka et al. 2014; Yamamoto et al. 2016)。PAS 具有液-液相分离的结构，它由 Atg1、Atg13 和 Atg17 之间的多价相互作用驱动形成(Yamamoto et al. 2016)，并提供了一个能使 Atg1 激酶发生自激活的环境(Fujioka et al. 2020)。ULK/Atg1 复合物的组装是启动巨噬细胞的关键步骤。

除了饥饿诱导的 ULK/Atg1 复合物组装，ULK/Atg1 复合物的组装也可由自噬货物蛋白驱动（图 1-6）。可溶性蛋白 SQSTM1（p62）与泛素化的自噬货物蛋白形成液态聚集体，并与 FIP200 相互作用以招募 ULK 复合物(Turco et al. 2019)。而在 Parkin 依赖性的线粒体自噬及对沙门氏菌的选择性降解过程中，另一个可溶性蛋白 NDP52 会定位到泛素化的线粒体或入侵细胞的沙门氏菌上，并通过与 FIP200 相互作用招募 ULK 复合物(Ravenhill et al. 2019; Vargas et al. 2019)。TAX1BP1 也可以招募 FIP200 到 SQSTM1 形成的液态凝集体中(Turco et al. 2021)。不依赖泛素化的选择性自噬的起始同样 ULK 复合物相关：如内质网自噬受体 CCPG1 与 FIP200 的 Claw 结构域互作来招募 ULK 复合物(Smith et al. 2018; Zhou et al. 2021)。

ULK 复合物组装完成后会招募 ATG9 囊泡，这一步是自噬体形成的关键(Sawa-Makarska et al. 2020)，ATG9 囊泡的招募由 ATG13-ATG101 亚复合物的 HORMA 结构域和 ATG9A 的 C 端区域之间的相互作用调控(Ren et al. 2023)。在 Parkin 依赖性的线粒体自噬过程中，ATG9 囊泡通过与定位在被泛素化的线粒体上的自噬受体 OPTN 相互作用而被招募(Yamano et al. 2020)。在酵母细胞中，Atg9 囊泡通过两种途径被招募：一种是在饥饿诱导的自噬过程中与 Atg13 的 HORMA 结构域相互作用而被招募，另一种则是在选择性自噬过程中通过货物适配蛋白 Atg11 相互作用而被招募(Coudeville et al. 2022)。

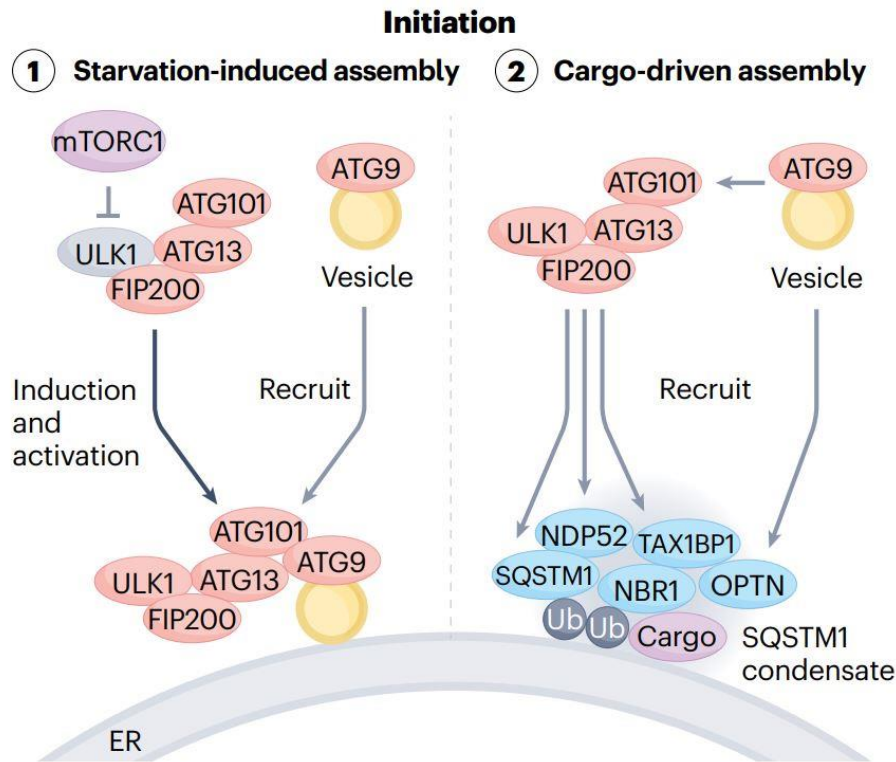


图 1-6 自噬起始 (Yamamoto et al. 2016)

Fig. 1-6 Autophagy initiation (Yamamoto et al. 2016)

1.2.2.2 自噬泡的膜伸长

自噬泡的膜伸长的步骤如图 1-7 所示。ULK 复合物首先招募 III 类磷脂酰肌醇 3-激酶复合物 I (PI3KC3-C1)，PI3KC3-C1 复合物在自噬泡相关结构的膜上负责生成磷脂酰肌醇 3-磷酸 (PI3P) 用于自噬泡膜的延长。PI3KC3-C1 由五个亚单位组成：包括 VPS34、VPS15、Beclin1 (酵母细胞中则是 Vps30)、ATG14 和 NRBF2 (酵母细胞中则是 Atg38)。PI3KC3-C1 通过 ATG14、Beclin1 和 VPS34 与膜结合发生重构，之后 VPS34 开始产生 PI3P (Baskaran et al. 2014; Hurley et al. 2017)。

重构后的 PI3KC3-C1 通过其 β 螺旋桨样结构结合多磷酸肌苷 (PROPPIN) 家族蛋白 (包括哺乳动物中的 WIPI 以及酵母细胞中的 Atg18、Atg21 和 Hsv2) 并进一步招募 ATG2。ATG2 可能通过与 WIPI3 或 WIPI4 的相互作用被引导到富含 PI3P 的自噬泡的膜上 (Ren et al. 2020; Zheng et al. 2017)。之后 ATG2 会形成一个杆状结构，其 N 端最末端附着在内质网膜上，其 C 端最末端附着在自噬泡的膜上 (Chowdhury et al. 2018; Zheng et al. 2017)。体外研究表明，磷脂通过 ATG2 的疏水腔进行转移，该转移过程发生在内质网与吞噬泡间 (Maeda et al.

2019; Osawa et al. 2019; Valverde et al. 2019)。但是调节及驱动磷脂转移的机制仍有待阐明。

哺乳动物中有四种 PROPPIN 家族蛋白 (WIPI1-4)，在四种同源蛋白中，WIPI2 的功能占主导地位，因为只有 WIPI2 的缺失会显著抑制自噬(Dooley et al. 2014)。WIPI2 与 ATG16L1 结合形成的复合物是 ATG12-ATG5-ATG16L1 复合物的一个组成部分，ATG12-ATG5-ATG16L1 复合物具有类似 E3 连接酶的活性，可以促进 ATG8 (在哺乳动物中又名 LC3 或者 GABARAP，以下统称 ATG8) 的脂质化。由于 ATG2 有一个 LC3 互作区域 (LC3-interacting region, LIR) (Bozic et al. 2020)，ATG8 可以进一步招募 ATG2。

在 ATG2 将脂质转移到自噬泡膜的外层后，ATG9 会形成一个三聚体并在内外层之间进行磷脂的转移(Ghanbarpour et al. 2021; Maeda et al. 2020; Matoba et al. 2020)。还有两种酶是内质网膜来源的自噬体形成所必需的：VMP1 和 TMEM41B(Ghanbarpour et al. 2021; Huang et al. 2021; Li et al. 2021)。这两个蛋白都是多次跨膜蛋白并有一个保守的 DedA 结构域(Mesdaghi et al. 2020; Okawa et al. 2021)。由于 ATG2A 与 ATG9，VMP1 和 TMEM41B 均可发生相互作用(Ghanbarpour et al. 2021)，VMP1/TMEM41B-ATG2-ATG9 可被视作一个专职脂质转移的结构单元，这些结构单元可以平衡由脂质转移所导致的内质网膜上磷脂密度的不平衡。酵母细胞中的 Tvp38 蛋白类似于哺乳动物细胞中 TMEM41B，但 Tvp38 不是酵母细胞中的自噬体形成所必需的蛋白(Okawa et al. 2021)。

ATG8 和 ATG12 这两个类泛素的连接系统在酵母细胞的自噬体形成中发挥作用。ATG8 和 ATG12 会与类似 E1 连接酶的 ATG7 和类似 E2 连接酶的 ATG3, ATG10 相配合，分别与磷脂酰乙醇胺和 ATG5 结合，所形成的 ATG12-ATG5-ATG16 (L1) 复合物具有类似 E3 连接酶的活性，可用于连接磷脂酰乙醇胺和 ATG8。虽然 ATG 连接系统对酵母细胞中的自噬体形成至关重要，但在哺乳动物细胞中这些系统的缺少对自噬体的生成没有影响(Fujita et al. 2008; Sou et al. 2008; Uemura et al. 2014)。在哺乳动物细胞中，ATG 连接系统与自噬体和溶酶体的融合或者是自噬体内层膜的降解有关(Nguyen et al. 2016; Tsuboyama et al. 2016)。

Membrane elongation

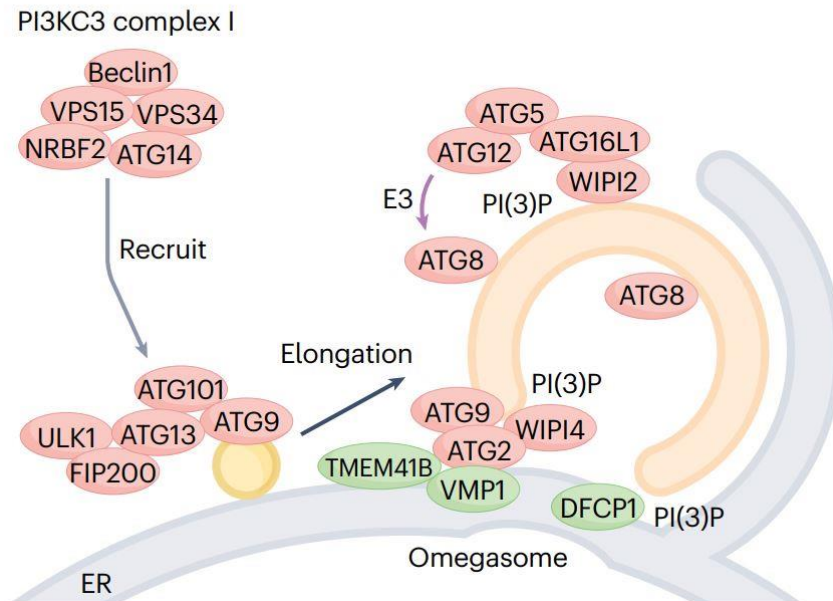


图 1-7 自噬泡的膜伸长 (Yamamoto et al. 2016)

Fig. 1-7 Autophagic membrane elongation (Yamamoto et al. 2016)

1.2.2.3 自噬货物蛋白的识别

由于自噬体吞噬了部分细胞质，大多数自噬体内的可溶性物质是非选择性被纳入自噬体的。然而，自噬体也能选择性地识别各种“货物”，包括受损的细胞器、细胞内细菌、病毒和某些蛋白质(Lamark et al. 2021)。

除了在自噬泡膜伸长中起到关键作用外，ATG8 在选择性自噬中的货物识别方面 also 具有重要功能。ATG8 直接与货物蛋白或自噬受体中的 LIR 基序（或酵母细胞中的 Atg8-interacting 基序）相互作用，自噬受体上 LIR 基序以“W/F/Y xx L/I/V”基序为特征(Birgisdottir Å et al. 2013)，这些自噬受体可被分为泛素依赖型和非泛素依赖型（图 1-8）。可识别被泛素货物蛋白的自噬受体包括 SQSTM1、NBR1、NDP52、OPTN、TAX1BP1 和 TOLLIP(Lamark et al. 2021)。这些自噬受体通过 LIR 与 LC3 结合并与自噬体相连，并可通过泛素结合域招募泛素化后的靶蛋白(Fracchiolla et al. 2017)。LIR 基序除了参与货物识别功能外还用于招募一些核心自噬组分，包括 FIP200、ULK1 和 ATG13(Alemu et al. 2012)，以及在自噬过程中起到连接作用的组分 PLEKHM1 和 EPG5(McEwan et al. 2015; Wang et al. 2016)。

非泛素依赖型的自噬受体包括与细胞器结合的内质网自噬受体（比如 CCPG1、TEX264、FAM134B、SEC62、RTN3L 和 ATL3）和线粒体自噬受体（如 BNIP3、BNIP3L/NIX、FUNDC1、FKBP8 和 BCL2L13），以及含有 LIR 基序的可溶性蛋白如 CALCOCO1(Lamark et al. 2021)。

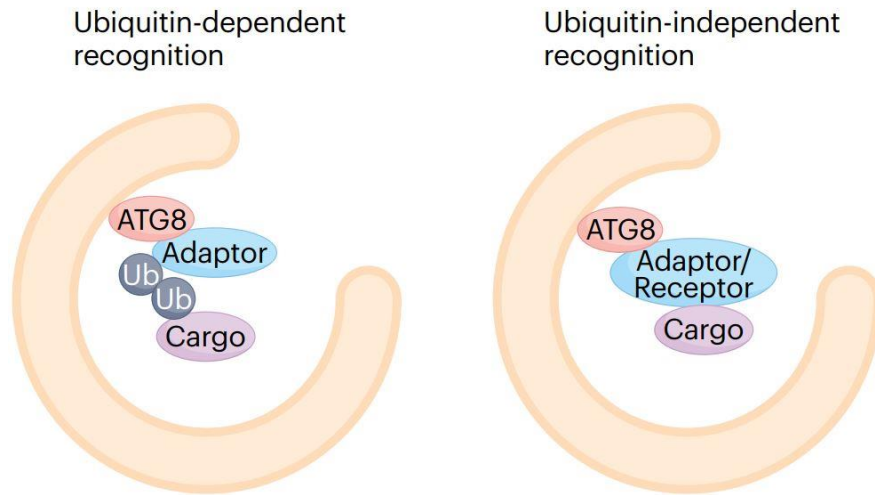


图 1-8 自噬货物的识别 (Yamamoto et al. 2016)

Fig. 1-8 Autophagy-related cargo recognition (Yamamoto et al. 2016)

1.2.2.4 自噬泡的封闭

自噬泡的封闭是由吞噬体膜向自噬体外膜和内膜的膜裂变所介导的，这在拓扑学上与多泡体中的腔内囊泡形成的膜裂解和质膜上的病毒出芽是相同的。与这两个过程一样，运输所需的内体分拣复合物（endosomal sorting complex required for transport, ESCRT）复合物在自噬体封闭中起到关键作用(Takahashi et al. 2018; Zhen et al. 2020; Zhou et al. 2019)。在哺乳动物细胞中，研究者仍不知道 ESCRT 复合物是如何定位到吞噬体膜的开放边缘的。在酵母细胞中，Atg17 和 Snf7（ESCRT-III 系统组分之一）与 Rab5 的相互作用可能是 ESCRT 复合物被招募到吞噬体膜的开放边缘的关键(Zhou et al. 2019)。

1.2.2.5 自噬溶酶体的形成

吞噬泡的膜封闭完成意味着自噬体的完全形成，自噬体接下来会与溶酶体融合形成自噬溶酶体。在哺乳动物细胞中，自噬体与溶酶体的融合是由可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体（SNARE）蛋白 STX17 和 YKT6 介导的，它们在吞噬泡的膜封闭前被招募到自噬体中从而防止未封闭的自噬泡和

溶酶体发生过早的融合(Itakura et al. 2012; Matsui et al. 2018)。研究者并未观察到 STX17 和 YKT6 的介导自噬体和溶酶体融合的功能存在差异性,很可能两者功能是相同的。UVRAG 和 ATG14 也被发现参与调控了自噬体与溶酶体的融合(Diao et al. 2015; Liang et al. 2008)。而且,贯穿自噬全程的 ATG8 也可能参与了自噬体和溶酶体的融合过程,因为位于自噬体膜上的 ATG8 可以招募磷脂酰肌醇-4-激酶 II α 并利用该酶生成磷脂酰肌醇-4-磷酸(PI4P),而 PI4P 可以促进自噬体和溶酶体的融合(Wang et al. 2015)。在酵母细胞中,STX17 是缺失的,发挥介导自噬体和溶酶体融合的功能的只有 YKT6(Bas et al. 2018; Gao et al. 2018)。

一些可以影响细胞肌动蛋白骨架的蛋白质在溶酶体与自噬体的融合中也发挥了作用。有研究表明微管系统可能是自噬体运输至溶酶体附近及自噬溶酶体形成的必要条件,但其机制仍未被完全解析(Fass et al. 2006; Kimura et al. 2008; Köchl et al. 2006)。有证据表明肌动蛋白的核化可能是介导自噬体与溶酶体融合的必要条件,在选择性自噬过程中,组蛋白去乙酰化酶 6(HDAC6)介导的 F-actin 重塑是自噬体与溶酶体融合的必要条件(Lee et al. 2010)。HDAC6 与泛素化的蛋白质聚集物结合并启动皮层肌动蛋白依赖性的 F-actin 重塑机制,在泛素化的蛋白质聚集物处新形成的 F-actin 会介导自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体(Lee et al. 2010)。在自噬体的外膜与溶酶体膜开始接触后,溶酶体内的具有降解作用的酶便会逐步释放至自噬溶酶体当中(Stanley et al. 2014),最后对自噬溶酶体中的蛋白质进行降解处理。

1.2.3 自噬调控病毒生命周期的简介与分类

除了维持细胞稳态的作用外,因为自噬具有降解蛋白质的能力,自噬在病毒生存周期中也发挥着重要作用,已被报道多次的如宿主细胞利用选择性自噬对病毒蛋白实现靶向性地降解(Deretic 2011; Keller et al. 2020; Orvedahl et al. 2009)。但是,在宿主和病原体的军备竞赛中,许多类型的病毒也已经进化出不同的机制来利用宿主的自噬系统来促进自身的复制(Mao et al. 2019)。例如,人副流感病毒 3 型(human Parainfluenza virus type 3, HPIV3)的磷酸化蛋白与 SNAP29 结合并抑制其与 STX17 的相互作用,从而阻止这两种宿主蛋白介导的自噬体与溶酶体的融合,并最终增加从细胞中释放的病毒粒子数量(Ding et al. 2014)。人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)的包膜蛋白 pp28

(又名 pUL99) 与自噬启动丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 ULK1 相互作用来促进胞外病毒粒子的产出(König et al. 2021)。这些研究说明了自噬这个细胞生理过程在对抗病毒感染上表现出的两面性, 即存在抑制病毒复制的自噬和促进病毒复制的自噬。

1.2.3.1 抗病毒自噬

自噬可以作为细胞固有的抗病毒手段之一发挥作用。甲病毒属的辛德比斯病毒(Sindbis Virus, SINV)在感染小鼠后, 小鼠脑组织中的 Beclin1 蛋白表达上升并可能通过自噬来降低神经元中的病毒粒子数量来减轻小鼠脑炎的强度(Liang et al. 1998)。进一步的研究揭示了自噬相关基因 ATG5 的功能缺失会增加小鼠的中枢神经系统对 SINV 的易感性, 体外研究则发现 SINV 的衣壳蛋白可以与 p62 相互作用, p62 基因敲除会使得病毒衣壳蛋白不再与自噬体共定位并使得病毒诱导的细胞死亡水平上升(Orvedahl et al. 2010), 说明 p62 通过与 SINV 的衣壳蛋白互作来引导其通过自噬降解最终促进 SINV 感染的神经元细胞的存活。

疱疹病毒属的单纯疱疹病毒 1 型(herpes simplex virus type 1, HSV-1)编码的病毒蛋白 ICP34.5 可以直接与 Beclin1 互作来抑制自噬发生进而产生更强的神经毒性(Orvedahl et al. 2007)。ICP34.5 蛋白的第 68 到 87 位氨基酸缺失的突变 HSV-1 在小鼠原代神经元上引起自噬体数量增加, 且该突变毒在小鼠脑组织中的复制速率降低, 引起的脑炎也没有达到亲本毒感染所导致的脑炎的强度(Smith et al. 1978; Tallóczy et al. 2006)。这意味着在中枢神经系统中, 自噬对于限制 HSV-1 感染是非常重要的。进一步的研究发现 HSV-1 的核衣壳蛋白在其转移至胞浆中时会被自噬体捕获并降解, 该过程由范可尼贫血(Fanconi anemia, FA)通路基因所调控(Sumpter et al. 2016)。

在水泡性口炎病毒(Vesicular Stomatitis Virus, VSV)的果蝇感染模型中, 研究者发现 VSV 的糖蛋白 G 可以作为病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)被细胞的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)Toll 样受体 7(Toll Like Receptor 7, TLR7)识别然后启动细胞自主反应进而激活自噬, 进而使得 VSV 的复制水平降低, 抑制自噬则会导致 VSV 复制水平和对果蝇的致病性上升。该反应由感应细胞营养供应的

磷脂酰肌醇 3-激酶 (Phosphoinositide 3-kinase, PI3K) -Akt 信号通路调控 (Shelly et al. 2009)。

在裂谷热病毒 (Rift Valley fever virus, RVFV) 的苍蝇感染模型中, 研究者发现 TLR7 同样可以通过激活自噬来限制 RVFV 复制。哺乳动物的 Toll 样受体适配蛋白 MyD88 是激活抗 RVFV 自噬的必要条件, 缺少该基因会使得 RVFV 感染无法引起自噬, RVFV 的复制速率上升。在小鼠和人类细胞中, RVFV 感染也会激活自噬, 且 RVFV 的复制速率在自噬相关基因 ATG5 的敲除情况下上升 (Moy et al. 2014)。

在奥赛病毒 (Orsay virus) 的线虫感染模型中, 研究者发现奥赛病毒的感染会导致泛素连接酶适配蛋白 F-box 及某些参与泛素化修饰介导的蛋白水解过程的基因的上调与富集, 这会使得病毒蛋白被蛋白酶体降解或者通过自噬最终被降解, 最终降低线虫体内的病毒滴度 (Bakowski et al. 2014)。

乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 的 Hbc 病毒蛋白可以与半乳糖凝集素 9 (GAL9) 蛋白互作, 同时 GBL9 通过与抗病毒蛋白 viperin 互作来生成三者共定位的胞内聚集物, 该聚集物可以增强 RNF13 的自泛素化, 进而招募 p62 并形成 LC3 阳性自噬体, 最终 Hbc 蛋白会通过自噬途径降解。由于 GAL9 和 viperin 均为 1 型干扰素刺激基因, 因此该机制也说明宿主细胞可以通过联合先天性免疫和自噬系统来对抗病毒感染 (Miyakawa et al. 2022)。

在甲型流感病毒 (Influenza A virus, IAV) 的小鼠感染模型中, 研究者发现自噬相关 16 样蛋白 1 (ATG16L1) 的 WD 结构域和连接结构域缺失的小鼠可以通过 ATG16L1 介导的非典型自噬来降低 IAV 对小鼠的致死率。而非典型自噬功能缺失的小鼠对低致病性 IAV 的敏感性提升, 病毒在整个肺部的复制加上由浆细胞树突状细胞介导的细胞因子增长, 最终导致肺部的炎症因子风暴, 小鼠死亡率上升 (Fletcher et al. 2018; Wang et al. 2021b)。线粒体自噬在 IAV 感染中也发挥着重要作用, Ripk2 基因敲除细胞的线粒体自噬发生缺陷, 导致线粒体损伤并产生更多的超氧化物, 最终导致 NLRP3 炎症小体的强烈激活及 IL-18 的增产, 这可能是 Ripk2 基因敲除的小鼠对 IAV 感染的敏感性提高的原因 (Lupfer et al. 2013)。同时, IAV 的 M2 蛋白与线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS) 互作, 且 M2 蛋白刺激了线粒体的活性氧

(Reactive oxygen species, ROS) 的产生, 最终使得 MAVS 信号通路激活, I 型干扰素增产并发挥抑制 IAV 复制的作用(Wang et al. 2019)。

人类免疫缺陷病毒 HIV 在感染的早期阶段可以进入中枢神经系统并导致神经功能紊乱, 包括神经变性和神经认知功能障碍, 这些神经功能紊乱与神经元的线粒体自噬紧密相关。HIV 的 gp120 病毒蛋白引起了线粒体动态平衡的改变, 并诱导线粒体在细胞核周围聚集及 dynamin 相关蛋白 1 (DRP1) 的线粒体转位现象发生, 这使得神经元线粒体发生破碎。另外, gp120 蛋白增强了 LC3B 蛋白的表达, 并诱导 p62 选择性地招募到受损线粒体, 最终使得线粒体自噬发生, 但是 gp120 引起的线粒体自噬属于不完全自噬, 因为包含线粒体的自噬体与溶酶体的融合被阻止, 这会导致线粒体自噬不完全使得神经元功能紊乱。但是, 这同样使得神经元的 NLRP3 信号通路不会强烈激活, 避免了过强的炎症对中枢神经系统的进一步损害(Teodorof-Diedrich et al. 2018; Thangaraj et al. 2018)。

1.2.3.2 促病毒自噬

多种病毒在与宿主自噬系统的协同进化中演变得到了利用自噬系统保障自身生存的能力。比如流感病毒 IAV 感染可以通过引起线粒体自噬来促进自身复制, IAV 的 PB1-F2 蛋白与线粒体上的 TUFM 蛋白互作进而引起自噬体形成, 最终导致线粒体自噬的发生, 这使得位于线粒体的 MAVS 信号通路的激活水平降低, IAV 可以更好的复制(Kuo et al. 2017; Wang et al. 2021a)。类似的, 有研究者发现 IAV 的 PB1 蛋白可以与自噬受体蛋白 NBR1 互作, 然后将泛素化的 MAVS 运送到自噬体中通过自噬途径降解。这同样使得 RIG-I-MAVS 介导的先天性免疫信号通路激活程度下降, 最终同样促进了 IAV 病毒感染(Zeng et al. 2021)。

人类疱疹病毒 8 型 (human herpesvirus-8, HHV-8) 编码的病毒干扰素调节因子 1 (vIRF-1) 通过激活线粒体自噬来清除线粒体来促进病毒复制。干扰 vIRF-1 的表达会抑制 HHV-8 复制引起的线粒体自噬并使得线粒体数量增加。此外, vIRF-1 可以直接与线粒体自噬受体 NIX 结合来激活 NIX 介导的线粒体自噬发生, 对线粒体自噬进行抑制可以降低 HHV-8 的复制速率(Vo et al. 2019)。

EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 编码的病毒蛋白 BHRF1 可以改变线粒体稳态并刺激 DNM1L/Drp1 介导的线粒体自噬发生。BHRF1 的表达使得线粒

体网络重组并在细胞核周围聚集，然后通过和 Beclin1 互作来引起完整的线粒体自噬发生，大量线粒体被溶酶体降解直接导致了 RIG-I-MAVS 介导的先天性免疫信号通路激活程度下降，最终促进了 EBV 的复制(Vilmen et al. 2021)。

HPIV3 的基质蛋白 M 可以与线粒体上的 TUFM 蛋白互作进而引起线粒体自噬，该过程不依赖于经典的 Parkin-PINK1 线粒体自噬通路，而是通过泛素化的 HPIV3 的 M 蛋白与 LC3 的直接互作引起自噬发生，M 蛋白在此过程中发挥了自噬受体的功能来进行 LC3 的招募。最终 M 蛋白引起相当数量的线粒体通过线粒体自噬被溶酶体降解，使得 MAVS 介导的先天性免疫信号通路激活程度下降，HPIV3 复制水平上升(Ding et al. 2017)。研究者同样发现新冠病毒(SARS-CoV-2)的基质蛋白 M 也可引起线粒体自噬，SARS-CoV-2 的 M 蛋白上具有 LIR 基序用于直接结合 LC3，因此其可作为自噬受体蛋白桥接 LC3 来引起自噬发生。与 HPIV3 的 M 蛋白类似，SARS-CoV-2 的 M 蛋白引起的线粒体自噬也使得 MAVS 介导的 I 型干扰素信号通路激活程度下降，I 型干扰素产生受阻，最终有利于 SARS-CoV-2 的复制(Hui et al. 2021)。这说明不同种类病毒的蛋白均可靶向线粒体来阻碍先天性免疫通路的激活，反映出在某些功能上病毒进化的趋同性。

寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)和登革热病毒(Dengue virus, DENV)利用内质网膜作为病毒复制工厂的囊膜来源，它们进化出了调节内质网自噬来促进病毒复制的机制。DENV 和 ZIKV 的 NS3 蛋白会导致 FAM134B 的降解，导致内质网形成和自噬体形成受阻进而促进病毒复制(Lennemann et al. 2017)。研究者还发现宿主细胞的 BPIFB3 (BPI fold-containing family B member 3)可以通过蛋白酶体降解 FAM134B 来协同 DENV 和 ZIKV 的 NS3 蛋白来调控内质网自噬来促进病毒复制(Evans et al. 2020)。FAM134B 也通过内质网自噬调控了埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)的复制，FAM134B 基因的敲除会提高 EBOV 的病毒复制水平(Chiramel et al. 2016)。

小鼠疱疹病毒 1 型(Murid herpesvirus 1)的 M45 蛋白可以通过独特的聚集体自噬来逃逸宿主细胞的先天性免疫反应。M45 可以诱导 NEMO 和受体相互作用丝氨酸苏氨酸激酶 1 (Receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1)聚集成大的不溶性蛋白，随后通过招募 VPS26B 和 TBC1D5 蛋白引起细胞自噬将不溶性蛋白聚合物降解，以此来削弱宿主细胞先天性免疫。此外，有研究表明 HSV-1

的 ICP6 蛋白也可抑制先天性免疫，其诱导 RIPK1 聚集和降解的方式与小鼠疱疹病毒 1 型的 M45 蛋白的作用方式类似(Muscolino et al. 2020)。

1.3 Nedd4 简介

Nedd4 中文名为神经前体细胞表达的发育下调蛋白 4 (Neuronally expressed developmentally downregulated 4)，是多结构域蛋白(Rotin et al. 2009)，如图 1-9 所示，其包含四个用于和 PPxY 结构域互作的 WW 结构域(Kanelis et al. 2001; Staub et al. 1996)。一个 N 端的 C2 结构域，其负责与磷脂结合介导蛋白定位至浆膜，内体以及多泡体上 (multivesicular body, MVB) (Dunn et al. 2004; Plant et al. 2000)。一个 C 端的 HECT 结构域，其具有的催化性的半胱氨酸 (C) 负责接受从 E2 泛素酶上转移来的泛素(Sudol 1996)。



图 1-9 Nedd4 的结构 (Rotin and Kumar. 2009)

Fig. 1-9 The structure of Nedd4 (Rotin and Kumar. 2009)

Nedd4 属于 HECT 型 E3 泛素连接酶。HECT 型 E3 泛素连接酶作为 E2 酶的泛素的接受者，其先将泛素连接至自身，再将泛素转移至底物蛋白上的某个赖氨酸 (K) 残基上来完成底物蛋白的泛素化修饰过程(Rotin et al. 2009)。Nedd4 在哺乳动物组织中广泛表达，并在许多生理过程中具有重要作用，比如促进细胞生长和调节细胞内的蛋白质运输(Cao et al. 2008; Pak et al. 2006; Saksena et al. 2007)

1.3.1 Nedd4 的功能

1.3.1.1 Nedd4 调控细胞增殖

Nedd4 在哺乳动物体内所有组织中均有表达。Nedd4 基因敲除的小鼠的体型变小且死亡率上升，且小鼠的胚胎成纤维细胞的有丝分裂活性下降，这说明 Nedd4 在细胞增殖和动物成长上发挥着正向调节的作用 (Cao et al. 2008; Fouladkou et al. 2008)。Nedd4 基因敲除的小鼠胚胎的生长速度减缓的原因是细胞表面胰岛素样生长因子 1 受体 (Insulin Like Growth Factor 1 Receptor, IGF1R) 的丰度下降从而降低了 IGF1 信号强度(Cao et al. 2008)。同时，有报道称生长因

子受体结合蛋白 10 (growth factor receptor-bound protein 10, GRB10) 这个 IGF1 和胰岛素信号通路的负调控因子也可与 Nedd4 直接结合(Morrione et al. 1999)。因此, 在 Nedd4 基因敲除的小鼠的胚胎成纤维细胞中再敲低 GRB10 可以将细胞表面 IGF1R 的丰度回复至正常水平, 而 Nedd4 基因敲除所导致的小鼠死亡率上升可以通过破坏小鼠的 GRB10 等位基因来使得小鼠死亡率回复至正常水平(Cao et al. 2008)。

1.3.1.2 Nedd4 调控离子通道降解及囊泡运输

在哺乳动物体内, 细胞的内吞作用和对众多跨膜蛋白的分拣功能与 Nedd4 相关, Nedd4 可以与上皮细胞钠离子通道 (ENaC) 的 PY 基序互作, 进而将 ENaC 泛素化并使得其通过内吞作用进入囊泡并随之降解(Harvey et al. 2001; Kamynina et al. 2001; Lu et al. 2007; Staub et al. 1996), 这使得上皮细胞中的钠离子含量不会过高并对机体中盐分和液体的平衡起到了维持稳定的作用。

Nedd4 调控着某些跨膜蛋白比如溶酶体相关跨膜蛋白 5 (lysosomal-associated protein transmembrane 5, LAPTM5) 的从高尔基体运输到溶酶体的运输(Pak et al. 2006)。细胞中对货物蛋白的囊泡运输经常涉及到细胞的转运必需内体分选复合体 (ESCRT) 系统, 其中有许多组分蛋白拥有识别泛素的结构域, Nedd4 也参与了 ESCRT 系统中对某些货物蛋白的泛素化修饰(Saksena et al. 2007)。

1.3.1.3 Nedd4 调控病毒出芽

某些病毒的蛋白上有着病毒出芽相关基序, 这些带有病毒出芽基序的病毒蛋白通常与参与宿主细胞内 ESCRT 系统的蛋白互作来挟持细胞自身囊泡运输系统以完成病毒出芽的目的(Morita et al. 2004)。例如逆转录病毒的 Gag 蛋白, 埃博拉病毒和马尔堡病毒的 VP40 蛋白, 弹状病毒科病毒的 M 蛋白, 拉萨热病毒和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒的 Z 蛋白, 它们均具有可与 Nedd4 及其家族蛋白的 WW 结构域互作的病毒出芽基序。这样的互作可以促进这些病毒蛋白被泛素化进而被 ESCRT 系统识别为货物蛋白, 使得这些病毒蛋白可以进入多泡体并最终利用囊泡运输系统出芽(Morita et al. 2004)。另外, 近些年有研究表明干扰素刺激基因 15 (ISG15) 可以与 Nedd4 结合并抑制其发挥泛素连接酶的活

性,这会导致与 Nedd4 结合的埃博拉病毒的 VP40 蛋白无法被泛素化,进而抑制其出芽(Malakhova et al. 2008; Okumura et al. 2008)。

1.3.1.4 Nedd4 与疾病

有研究指出, Nedd4 对肿瘤抑制蛋白 PTEN 存在影响因而具有致癌作用(Wang et al. 2007)。虽然 Nedd4 介导的 PTEN 的多泛素化可以使 PTEN 被蛋白酶体降解, Nedd4 介导的单泛素化则会引导 PTEN 入核,进而使得 PTEN 无法被降解且可以发挥染色体完整性的功能(Trotman et al. 2007)。但是这些结论无法在体内实验中得到证明,因为在 Nedd4 基因敲除的小鼠细胞中未检测到 PTEN 蛋白水平的改变以及其核转移现象(Cao et al. 2008; Fouladkou et al. 2008; Yang et al. 2008)。而且在培养细胞中进行 Nedd4 基因的敲低也不影响 PTEN 的水平,这意味着 Nedd4 并不会在 PTEN 上发挥其 E3 泛素连接酶功能(Fouladkou et al. 2008)。Nedd4 敲除的小鼠胚胎除了生长迟缓这一现象外,还会出现心脏缺陷及出血问题,这表明 Nedd4 可能也在心脏发育中发挥作用(Cao et al. 2008)。

Nedd4 在 T 细胞功能上也有作用, Nedd4 基因敲除的 T 细胞发育正常但是增殖速度和 IL-2 的产生水平均有降低,这意味着 Nedd4 可以促进 T 细胞的活化。该功能可能与另一种 E3 泛素连接酶: Cbl 原癌基因 B (CBLB) 有关,因为 CBLB 基因在 Nedd4 敲除的 T 细胞中的表达水平是显著上升的(Yang et al. 2008)。

1.3.1.5 Nedd4 与自噬

有研究表明 Nedd4 相互作用并参与了自噬体的形成(Sun et al. 2017)。Nedd4 通过 C2 和 WW 结构域之间的一个保守的 LIR 与 LC3 结合。在细胞中敲除 Nedd4 基因后,饥饿处理或雷帕霉素诱导的自噬发生会受到影响,且使得 LC3 点状聚集与内质网共定位。此外, SQSTM1 (即 p62) 可被 Nedd4 泛素化,这同样暗示着 Nedd4 参与了细胞自噬。另一批研究者纯化得到了 Nedd4 与 LC3 的共结晶并解析了其结构(Qiu et al. 2017),确定了 Nedd4 可通过其第二个 LIR 与 LC3 直接互作,将 Nedd4 的第二个 LIR 突变后 Nedd4 便无法再与 LC3 互作。更有趣的是, Nedd4 与 LC3 的结合可以增强细胞中 Nedd4 的泛素连接酶活性。这些结果暗示着 Nedd4 可能广泛且深入的参与了细胞自噬过程。

1.4 Myo1c 简介

Myo1c, 中文名称为肌球蛋白 1c (Myosin IC), 在一系列细胞运动相关生理活动中均发挥着重要作用。Myo1c 参与脂筏的运输以及整合素介导的细胞迁移相关通路的调节(Arif et al. 2011; Brandstaetter et al. 2012)。它在耳毛细胞静纤毛的适应性应答中起关键作用(Batters et al. 2004; Gillespie et al. 2004)。Myo1c 基因突变会导致人类的听力损失(Zadro et al. 2009)。Myo1c 对脂肪细胞和骨骼肌中的胰岛素刺激引起的葡萄糖摄取极为重要(Bose et al. 2002; Bose et al. 2004; Toyoda et al. 2011)。在胰岛素刺激下, 葡萄糖转运体 4 (GLUT4) 从细胞内的 GLUT4 储存泡中转运到质膜上, 在质膜上整合并促进葡萄糖的转运。GLUT4 的胞吐需要 Myo1c 与小 GTP 酶 RalA 和胞吐复合体组分 Sec5 以 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖的方式进行结合, 从而将 GLUT4 储存泡与质膜相连(Chen et al. 2007)。

在胰岛素刺激下, Myo1c 的第 701 位的丝氨酸被 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖激酶 II (CaMKII) 磷酸化, 磷酸化的 Myo1c 会与 14-3-3 蛋白相互作用, 破坏该相互作用会使脂肪细胞在胰岛素刺激下的葡萄糖摄取受到影响(Yip et al. 2008)。

Myo1c 的稳态 ATP 酶活性在不同的 Ca^{2+} 浓度下保持不变, 而 ATP 酶作用过程中的单个速率常数受到 Ca^{2+} 浓度的调节。例如, 在高 Ca^{2+} 浓度下, 弱或非肌动蛋白结合状态的 Myo1c 寿命会增加(Adamek et al. 2008)。因此推测 Ca^{2+} 浓度的变化会影响 Myo1c 的 ATP 酶作用过程中 Myo1c 与丝状肌动蛋白 (F-actin) 保持强互作的时长。

有研究发现 Myo1c 的缺少会导致细胞内胆固醇的增加及定位变化, 同时会阻碍溶酶体和自噬体的融合进而使得自噬体数量增加(Brandstaetter et al. 2014)。另有研究发现敲低 Myo1c 会减少 Myo1c 及 F-actin 与 LC3 或者溶酶体关联膜蛋白 1 (lysosomal associated membrane protein 1, LAMP1) 的共定位现象, 暗示着 Myo1c 可能通过 F-actin 网络来影响溶酶体和自噬体的融合(Zhang et al. 2019)。

1.5 研究目的与意义

研究目的：随着近些年对各种病毒出芽机制的深入研究，研究者们发现了一系列与病毒出芽相关的蛋白及其上面的特征性基序或者结构域。其中，存在于丽沙病毒等多种病毒上的 PPxY 基序被确定与病毒出芽密切相关，但详尽的分子机制却仍未被报道。本课题旨在揭示狂犬病病毒 RABV 的 M 蛋白通过其 PPxY 基序引起自噬来促进病毒出芽的机制，并确定其对 RABV 致病性的影响。

研究意义：本课题重点研究丽沙病毒属的狂犬病病毒 RABV 如何通过其基质蛋白 M 引起细胞自噬并促进病毒出芽，并将 RABV-M 上发现的机制延伸至丽沙病毒属病毒的 M 蛋白，为解析狂犬病病毒的致病机制提供了新的思路，并为抗狂犬病病毒的小分子药物研发奠定了理论基础。

第二章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞、毒株、质粒和感受态菌种

小鼠神经母细胞瘤 N2a 细胞，人类神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞，人胚胎肾细胞 HEK-293T，BSR 细胞（仓鼠肾细胞 BHK-21 的一个单克隆细胞系），所有细胞均在含有 10%胎牛血清（Fetal bovine serum, FBS）的 DMEM 培养基中培养。

实验室致弱毒株 CVS-B2c（RABV）由标准攻毒株 CVS-24 在 BHK-21 细胞中连续传代得到，由本实验室扩增并保存。亲本毒 rCVS-B2c（rRABV）由本实验室通过转染基因组质粒及辅助质粒到 N2a 细胞拯救得到，由本实验室扩增并保存。

pcDNA3.1-CVS，pcDNA3.1-N，pcDNA3.1-P，pcDNA3.1-G，pcDNA3.1-L，pCAGGS，pCAGGS-FLAG，pCAGGS-HA 均由实验室保存。pGEX-6P-1 由华中农业大学彭贵青教授惠赠。GFP-LC3 由华中农业大学周红波教授惠赠。mCherry-GFP-LC3 和 HA-Ub 由武汉大学陈明周教授惠赠。

分子克隆实验中所用感受态为大肠杆菌 XL-10 菌株，蛋白原核表达实验中所用感受态为 BL21 菌株，均由实验室制备。

2.1.2 实验试剂、抗体和动物

胎牛血清 FBS 购自美国 Gibco 公司。

细胞培养基 DMEM 和青霉素和链霉素（100×）购自美国 Sigma 公司。

反转录试剂 HiScript®II Q RT SuperMix 及荧光定量试剂 SYBR GREEN 购自南京 Vazyme 公司。

蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自美国 Roche 公司。

裂解液 RIPA（强）购自武汉碧云天公司。

PVDF 膜购自美国 Bio-rad 公司。

辣根过氧化氢酶（Horseradish Peroxidase, HRP）标记的山羊抗小鼠 IgG 购自于博士德生物技术有限公司。HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgG1 购自于北京博奥龙免疫技术有限公司。

TMB 显色液底物购自于北京碧云天生物技术有限公司。

Rapamycin（GC15031），PYZD-4409（GC17801），Chloroquine（GC19549），3-Methyladenine（GC10710），和 Heclin（GC40877）均购买自 Glpbio 公司。

针对 FLAG-tag（M185-3L），HA-tag（M180-3），GAPDH（M171-3），和 β -actin（M177-3）的鼠单抗均购买自 Medical & Biological Laboratories 公司。针对 HA-tag（51064-2-AP）的兔多抗购买自 ProteinTech 公司。针对 Myo1c（PA5-93297）的兔多抗购买自 Invitrogen 公司。针对 Nedd4（21698-1-AP）的兔多抗购买自 ProteinTech 公司。针对 LC3（A19665），SQSTM1/p62（A19700），GFP（AE012），和 GST（AE001）的兔源抗体均购买自 ABclonal Technology 公司。针对 CVS-B2c 毒株的 N 蛋白和 P 蛋白的鼠单抗和针对 G 蛋白的鼠多抗由实验室制备。针对 M 蛋白的鼠单抗由南京农业大学栗硕教授惠赠。

6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠购自中国武汉的湖北省疾病预防控制中心。动物实验伦理号为：HZAU-MO-2021-0063。

2.1.3 实验仪器

表 2-1 实验仪器的名称、厂商及型号

Table. 2-1 Name, manufacturer and model number of the laboratory apparatus

仪器名称	产商	型号
生物安全柜	美国 LABCONCO 公司	Nu-440
CO ₂ 细胞培养箱	日本 SANYO 公司	MCO—20AIC
高速冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司	5810R
超速冷冻离心机	美国 Beckman 公司	Optima XE
冰冻切片机	德国 Leica 公司	CM 1520
生物光学显微镜	日本 Nikon 公司	Nikon80i
荧光倒置显微镜	日本 OLYMPUS 公司	IX51
-80 °C超低温冰箱	海尔公司	DW-86L626
超净纯水仪	美国 Milipore 公司	Milli-Q® IQ7000
水浴锅	上海精宏公司	DK-8D
PCR 仪	美国 AppliedBiosystems 公司	Veriti 96 Well Thermal Cyclers
制冰机	美国 Scotsman 公司	AF-103
电泳仪	美国 Bio-rad 公司	Powerpac Basic
共聚焦显微镜	德国卡尔蔡司公司	LSM880
透射电镜	日本 HITACHI 公司	H-7650
分光光度计	美国 Thermo Scientific 公司	NanoDrop One
荧光定量 PCR 仪	美国 Bio-rad 公司	T100
化学发光成像系统	美国 GE 公司	Amersham Imager 600

2.2 实验方法

2.2.1 感染性克隆空质粒的构建

- (1) 将感染性克隆空质粒 rRABV 使用 BlnI 和 PacI 双酶切, 55 °C水浴反应 3 h。将反应产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 使用凝胶回收试剂盒回收酶切产物, 测定酶切产物的浓度及纯度。
- (2) 酶切后的 rRABV 与 M 基因序列突变的片段进行连接, 反应体系充分混匀后, 16 °C水浴连接过夜得到连接产物。
- (3) 连接产物的转化: 取出 XL-10 感受态细胞, 置于冰上约 5 分钟待其解冻。将连接产物加入到感受态细胞中, 轻轻吹打混匀。冰上放置 20 分钟, 42 °C水浴热激 90 秒, 置于冰上 2 分钟, 加入 600 μ l 无抗生素的液体 LB 培养基, 37 °C振荡培养约 1 h, 4000 rpm 离心 5 分钟, 弃掉部分上清, 留下约 100 μ l 培养基, 重悬菌体。将 100 μ l 重悬菌体加入到含有博来霉素的固体 LB 平板, 用无菌三角棒将菌液涂匀整个平板。37 °C恒温培养箱培养 12 h, 待长出菌落后, 通过菌落 PCR 鉴定阳性菌落; 用灭菌枪头挑取阳性单菌落, 加到博来霉素抗性液体 LB 培养基中, 37 °C避光振荡培养 12 h。
- (4) 将质粒从扩大的菌液中提取出来, 使用质粒小量提取试剂盒 (OMEGA) 提取质粒, 步骤参考说明书。质粒送武汉擎科生物公司测序, 确认序列是否正确。

2.2.2 细胞的复苏与传代

- (1) 从液氮中取出冻存的细胞, 快速放置于 37 °C水浴锅中, 振荡融化 2 至 3 分钟, 1500 rpm 水平离心 10 分钟, 在细胞超净台中弃掉冻存液。当细胞汇合度达到 80%时, 将保存的 P1 代毒取出 100 μ l 接种。
- (2) 加入 DMEM 培养基+10% FBS 1 ml, 充分吹打混匀后, 转入 T25 细胞培养瓶中, 加入 4 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。
- (3) 待细胞刚长满细胞瓶底部时, 传代细胞; 在细胞超净台中打开细胞瓶, 弃除培养基, 加入 37 °C预热的 PBS 缓冲液清洗细胞并弃掉。

- (4) 加入 37 °C 预热的胰酶 1 ml，来回轻轻晃动细胞瓶，使所有细胞充分接触胰酶，弃除胰酶，放入 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中消化 2 分钟。
- (5) 轻轻振荡细胞瓶，当细胞开始脱落瓶底时，加入 6 ml DMEM 培养基+10% FBS 终止消化，用移液管轻轻吹下瓶底细胞，反复轻轻吹打，使细胞充分吹散。
- (6) 吸取 1 ml 细胞悬液到 T25 细胞培养瓶中，补加 DMEM 培养基+10% FBS 4 ml，充分混匀后，置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

2.2.3 重组 RABV 的拯救

- (1) 将 N2a 细胞铺板 6 孔板，约 $3\sim4\times 10^5$ 个细胞/孔，使 24 小时后细胞底部汇合度达到 70%-80%。
- (2) 取出 6 孔板，用 2 ml 37 °C 预热的 PBS 清洗细胞 1 次。
- (3) JetPrime 转染试剂 15 μ l、RABV 感染性克隆 2.0 μ g、辅助质粒 pCDNA3.1-N 0.5 μ g、pCDNA3.1-P 0.25 μ g、pCDNA3.1-G 0.15 μ g、pCDNA3.1-L 0.1 μ g 充分混匀于 JetPrime buffer 后转染 N2a 细胞，37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 5 小时。
- (4) 弃除上层培养液后，加入 2 ml DMEM 培养基+2% FBS，于 34 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。
- (5) 转染后第 3 d，弃除培养基，加入 2 ml 新鲜的 DMEM+2% FBS。
- (6) 转染后第 5 d，收集培养基上清，4 °C 12000 rpm 离心 20 分钟后，将培养基上清分装，-80 °C 贮存。

2.2.4 重组 RABV 的扩大

- (1) 将 BSR 细胞传代 T75 或 T225 细胞瓶，待细胞汇合度达到 70%-80%后，以 MOI=0.01 的剂量分别接种各重组 RABVs，感染作用 1 小时后，更换 DMEM+2% FBS 15 ml，于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。
- (2) 感染第 4 d 后，收获培养基上清，6000 rpm 离心 20 分钟以去除细胞残渣，将离心后的上清转到新的 50 ml EP 管中。
- (3) 将离心后上清分装 1.5 ml EP 管，标明批次，取出三支测定 RABV 毒价，其余于 -80 °C 中贮存。

2.2.5 病毒的滴度测定

- (1) 取 8 支无菌 1.5 ml EP 管，排布在 EP 管架上，每管加入 900 μl DMEM+10% FBS 的细胞培养液。
- (2) 将 100 μl 病毒原液加到第一支 EP 管中，用吸管吹打 10 次，直到混匀；吸取 100 μl 到下一个 EP 管，用吸管吹打 10 次，如此反复梯度稀释，直到第八管。
- (3) 取出 96 孔细胞培养板，以 4 行 8 列为一个测试区，每个区域均为 4×8 孔。
- (4) 在第一列中加入 100 μl 10^{-1} 稀释后病毒液，在第二列中加入 100 μl 10^{-2} 稀释后的病毒液，在第三列中加入 100 μl 10^{-3} 稀释后的病毒液，依次类推，直到第八列，每个稀释度加 4 个孔。该过程全程在冰上操作，病毒液一旦加完，要尽快加入 BSR 细胞。
- (5) 将约 2×10^4 个 BSR 细胞（100 μl ）加到每个孔中，于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。
- (6) 第 3 d 后，取出 96 孔细胞板，弃除培养基上清，用 PBS 洗涤 2 次，5 分钟/次，将残留 PBS 彻底弃除后，用 80% 冰冷的丙酮固定细胞 30 分钟，用 PBS 洗涤 2 次，5 分钟/次。
- (7) 用 FITC 偶联的抗 RABV-N 单克隆抗体对细胞染色，50 μl /孔，在室温避光条件下孵育 1 小时后，用 PBS 洗涤 3 次，要尽快拿到显微镜下观察。
- (8) 通过 Olympus IX51 荧光显微镜计数抗原阳性荧光斑点。
- (9) 阳性判断标准：该染色过程为细胞质染色，能够看到细胞轮廓。只要有一个区域发现特异性染色，该孔即判为阳性。杂质染色是没有细胞形态的亮点，为阴性孔。
- (10) 病毒滴度依照 Reed-muench 法计算为每毫升荧光焦点单位（Fluorescent focus units per milliliter, FFU/ml）。病毒毒价计算如下：计算公式为： $\text{Lg}(\text{FFU}) = X_0 - d/2 + d * (n_0 + n_1 + \dots + n_k) / N + 1$ 。X0 表示 100% 被感染的稀释倍数的对数值，d 表示稀释倍数的对数值，n 表示 100% 被感染到 100% 未被感染的稀释度阳性孔数，N 表示不同稀释度的重复孔数。

2.2.6 Western blot

- (1) 转染各质粒的 N2a 和 SK-N-SH 细胞在转染后 36 小时开始收样，在补充有蛋白酶抑制剂 Cocktail 的 RIPA（强）裂解液中裂解 30 分钟，收集的细胞裂解液离心去除细胞碎片。
- (2) 按照说明书要求对收集的细胞裂解液进行 BCA 蛋白浓度测定后进行调平。
- (3) 配置 12-14% 的 SDS-PAGE 胶。
- (4) 每孔加入样品后在 SDS-PAGE 胶中电泳。
- (5) 电泳结束后去除凝胶，湿转至 PVDF 膜。
- (6) 转好的膜放置在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 1 至 3 小时。
- (7) 封闭完成的膜进行一抗的 4° 过夜孵育。
- (8) TBST 洗膜 3 遍后加入 HRP 标记的对应的二抗，室温孵育 1h。
- (9) TBST 洗膜 3 遍，然后用 ECL 化学发光底物显色，于化学发光成像系统中成像并拍照。最后使用 ImageJ 软件对蛋白条带的灰度值进行计算。

2.2.7 间接免疫荧光

用 GFP-LC3 质粒和 pCAGGS 载体、FLAG-RABV-N、RABV-P-FLAG、RABV-M-FLAG、RABV-G-FLAG 或 RABV-M-FLAG 的突变体共同转染 N2a 和 SK-SH 细胞 36 小时，用 PBS 洗三次，用 4% 多聚甲醛在室温下固定 30 分钟，再用 PBS 洗三次。然后用 0.1% 的 Triton X-100 对细胞进行透化。1% Triton X-100，然后用 10% 山羊血清阻断，用 PBS 稀释 2 小时，用抗 FLAG 抗体进行一抗的 4 °C 过夜孵育，然后用山羊抗小鼠 IgG Dylight™ 594 连接的抗体作为第二抗体在室温下处理 1 小时。细胞核用 4, 6-二脒基-2-苯基吡啶（DAPI）在室温下染色 10 分钟。细胞再用 PBS 清洗三次，然后用 Zeiss LSM 880 共聚焦显微镜在油镜下成像。利用 1024x1024 像素的分辨率，平均 2 张图片的数量来获取所有的共聚焦图像。

为了对活细胞中的细胞核进行染色，用 Hoechst 33342 在 37 °C，含有 5% 的二氧化碳培养箱中处理 N2a 细胞 15 分钟。然后在 Zeiss LSM 880 下对染色和活细胞进行成像。

为了在 RABV-M 或其突变体表达时对内源性 Nedd4 进行染色，将 N2a 细胞

分别转染 RABV-M-FLAG 和其突变体 36 小时，然后用针对 Nedd4 和 FLAG-tag 的抗体，然后用 Alexa Fluor™ 488 山羊抗兔 IgG 和山羊抗鼠 IgG DyLight™ 594 连接的抗体作为二抗进行孵育。

为了对溶酶体进行染色，在培养基中加入 50 nM Lyso-Tracker Red。15 分钟后除去培养基，用 PBS 冲洗活细胞 3 次。然后在 Zeiss LSM 880 下对被染色的活细胞进行成像。

为了观察自噬流，将 N2a 细胞与 mCherry-GFP-LC3 质粒和 pCAGGS 载体或 RABV-M-FLAG 共转染 36 小时，然后在 Zeiss LSM 880 下成像。

对于 N2a 细胞中 F-actin 的染色，使用 phalloidin-Alexa Fluor 594 作为二抗，在室温下处理细胞 1 小时。

为了分析 RABV-G 和 RABV-M 的亚细胞定位。将 N2a 细胞与 RABV-G-HA 和 RABV-M-FLAG，或 RABV-M-FLAG 的突变体共转染 36 小时，或与 RABV-G-HA 和 RABV-M-FLAG 共转染 12 小时，然后用 3-MA (1mM) 处理 24 小时。细胞用抗 FLAG 和抗 HA 抗体进行一抗孵育，然后用 Alexa Fluor™ 488 山羊抗兔 IgG 和山羊抗鼠 IgG DyLight™ 594 连接的抗体作为二抗进行孵育。

为了获得感染或转染的 N2a 细胞的三维图像，利用 1024x1024 像素的分辨率，1 微米的 Z-堆栈间隔来获得所需的细胞体积，并将所得的 Z-堆栈导入 ZEN 软件 (2.3 版本)，利用采集参数获得渲染的三维体积。

2.2.8 透射电子显微镜观察类病毒颗粒 (VLP) 或病毒

用指定的质粒转染 N2a 细胞，或用 RABV 感染 N2a，然后在转染 36 小时和感染后 24 小时开始样品处理，首先在室温下用 2.5%戊二醛在 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 中固定细胞 4 小时。然后用 1%的四氧化锇固定细胞，用分级的乙醇逐步脱水，并嵌入环氧树脂 (Sigma)。使用切片机获得 60 纳米到 80 纳米大小的超薄切片，然后用醋酸铀和柠檬酸铅染色。用 H-7650 透射电子显微镜 (日立公司，日本) 拍摄图像。

2.2.9 免疫共沉淀

为了进行共同免疫沉淀试验，N2a 细胞与表达不同目标蛋白的哺乳动物表达载体 pCAGGS 共同转染。在转染后 36 小时，用 RIPA 缓冲液 (P0013，

Beyotime) 和蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (Roche) 在冰上裂解细胞 30 分钟。将细胞裂解液在 12,000 rpm 和 4 °C 下离心 10 分钟, 并将上清液转移到一个新的试管中, 用 rProtein A/G MagPoly Beads (SM01505, Smart-lifesciences, 中国) 在 4 °C 下预处理 1 小时以去除磁珠上的非特异性结合蛋白。将预处理过的上清液与针对 FLAG 或 HA 的 mAbs 在 4 °C 下进一步孵育过夜, 然后加入用 PBS 洗过的新鲜磁珠, 在 4 °C 下旋转孵育 3 小时。然后用冰冷的 PBS 洗涤 5 次, 用 4× SDS-PAGE 加载缓冲液煮沸洗脱结合的蛋白质, 用指定的抗体进行 Western 印迹分析。

2.2.10 GST pull-down

在 BL21 细胞中表达 GST 或 GST-RABV-M (GST-M), 用 ProFound GST 下拉蛋白-蛋白相互作用试剂盒 (Pierce) 提供的裂解缓冲液处理, 并在室温下孵育 30 分钟。在 13,000 rpm 下离心 30 分钟后, 将等量的上清液与 293T 细胞裂解液中的 HA-Nedd4 或 GFP-LC3 混合。根据制造商的协议, 用 ProFound GST 下拉蛋白-蛋白相互作用试剂盒进行 GST 下拉试验。

在真核细胞中进行 GST 下拉试验时, 在 293T 细胞中表达 GST、GST-M 和 GFP-LC3, 48 小时后, 收获细胞, 用 10 mL PBS 重悬, 并通过超声处理 15 分钟裂解。在 4 °C 下以 10,000 rpm 离心 10 分钟后收集上清液, 然后加入 GST 亲和柱中, 在 4 °C 下旋转孵育 20 分钟。用含有 147 nM NaCl 的 PBS 和含有 500 nM NaCl 的 PBS 交替洗涤该柱。将等量的 GFP-LC3 细胞裂解液加入亲和柱中, 在 4 °C 下旋转孵育 1 小时, 用含 147 nM NaCl 的 PBS 和含 500 nM NaCl 的 PBS 交替洗涤。纯化的蛋白用 10 mM 还原谷胱甘肽洗脱, 用 SDS-PAGE 分离, 并进行 Western blot 检测。

2.2.11 siRNA

小鼠 Nedd4 特异性和小鼠 Myo1c 特异性 siRNA 是由 GenePharma (中国上海) 设计和合成的, 其序列如表 2-2 所示。小鼠 ATG5 特异性 siRNA 和阴性对照 (NC) siRNA 均购自 GenePharma。为了敲除目标基因, 根据制造商的说明, 将最终浓度为 50nM 的 siRNA 转染到 N2a 细胞。

表 2-2 针对 Nedd4 和 Myo1c 的 siRNAs
Table.2-2 Nedd4 and Myo1c specific siRNAs

siRNAs	Sequence (5'-3')
Nedd4 No. 1	CCAAGAAGUCACAAAUCAATT
Nedd4 No. 2	GCAGCUUGCAGACCUGUAUTT
Nedd4 No. 3	CCAAUGACCUGGGACCCUUTT
Myo1c No. 1	CCGGGAGAACCUCAUUUAUTT
Myo1c No. 2	GGAAGGCGCUGUCCGUCAUTT
Myo1c No. 3	CCUUGAACAGGCGGCAUAUTT

2.2.12 荧光定量 PCR

用 Nedd4 或 Myo1c 的 siRNA 转染 N2a 细胞，收集 RNA 进行分离。收集雌性 C57BL/6 小鼠（6 周龄，n = 15）的脑组织，用 25 μ L 的 rRABV 或 rRABV-M-APxY（200FFU）进行颅内（i.c）接种。使用 TRIzol（Invitrogen）对脑组织和细胞进行 RNA 分离。用 TURBO DNA-free™试剂盒（Invitrogen, AM1907）按照制造商的说明消除基因组 DNA。使用 NanoDrop 2000（Thermo Scientific）评估 RNA 质量。使用 ReverTra Ace qPCR RT MasterMix（Toyobo, FSQ-201）或 First-Strand cDNA Synthesis Kit（Toyobo, FSK-101）合成 cDNA，使用 SYBR Green Supermix（Bio-Rad, 172-5124）进行 qPCR。qPCR 所使用的引物对如表 2-3 所示。

为了量化 RABV-N 的 mRNA 水平，使用 AMV 逆转录酶 XL（TAKARA，Kusatsu，日本）和 RABV-N 基因的特异引物转录总 RNA。从连续稀释的携带 RABV-N 基因的质粒中生成标准曲线，并将 RABV-N mRNA 的拷贝数归一到 1 毫克的总 RNA。

表 2-3 qPCR 所用引物
Table.2-3 Primers for qPCR

Primer	Sequence (5'-3')
RABV-N-F	ACACCGCAACTACAAGACA
RABV-N-R	ATGGTACTCCAGTTGGCACA
β -actin-F	AGGTGACAGCATTGCTTCTG
β -actin-R	GCTGCCTCAACACCTCAAC
Nedd4-F	TCGGAGGACGAGGTATGGG

Nedd4-R	GGTACGGATCAGCAGTGAACA
Myo1c-F	ATGGAGAGCGCCTTGACTG
Myo1c-R	TCGGTAGGGATTGACAGAGAC

2.2.13 狂犬病病毒 VLP 的纯化和验证

用 pCAGGS-RABV-G 和 pCAGGS-RABV-M 或其突变体以 6: 1 的摩尔比转染 N2a 或 SK-N-SH 细胞。在转染后 48 小时收获培养上清液。收获的上清液首先在 2000g (4 °C, 30 分钟) 下离心以去除细胞碎片, 然后在 25000g (4 °C, 3 小时) 下通超速离心进行浓缩纯化。纯化的 VLPs 在 4 °C 下重悬于 PBS 中过夜, 并通过 Western 印迹进行分析。

2.2.14 病毒的多步生长曲线测定

- (1) 将 BSR 或 N2a 细胞铺板 24 孔板, 待细胞汇合度达 70%-80% 时, 弃除培养基上清, 用 PBS 洗涤 2 次。
- (2) 将 rRABV 和 rRABV-M-APxY 分别以 MOI=0.01 的剂量感染 BSR 或 N2a 细胞, 每种重组病毒设立 3 个重复, 感染 1 小时后, 更换 DMEM+2% FBS 15 ml, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。
- (3) 在感染后的第 1, 2, 3, 4 和 5 天, 收集培养基上清, 6000 rpm 离心 20 分钟以去除细胞残渣, 将离心后的上清转到新的 1.5 ml EP 管中。
- (4) 采用上述病毒滴定的方法测定感染不同天数的 rRABV 和 rRABV-M-APxY 毒价, 并绘制多步生长曲线。

2.2.15 小鼠攻毒实验

6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠随机分成 2 组, 每组 30 只, 分别用 25 μ L 的 rRABV 或 rRABV-M-APxY (200 FFU) 进行颅内注射。每组 10 只小鼠每天监测小鼠的体重和死亡率的变化。检测时间为 20 天。每组各取 5 只小鼠在攻毒 6 天后用二氧化碳安乐死, 然后用 PBS 进行心内灌注, 再收获它们的脑组织进行组织病理学和免疫组织化学研究。在攻毒的 2, 4, 6 天分别取每组 5 只小鼠, 用二氧化碳进行安乐死, 然后用 PBS 进行心内灌注, 再收获它们的脑组织进行狂犬病病毒的绝对定量实验。

2.2.16 小鼠脑切片制作

- (1) 用 rRABV 或 rRABV-M-APxY 对各组雌性 C57BL/6 小鼠进行鼻内攻毒。感染后 6 天，用二氧化碳对小鼠进行安乐死。
- (2) 将小鼠固定，打开胸腔，在肺部剪开一个切口，然后对心脏进行至少 20 ml PBS 的灌注，然后再灌注 20 ml 的 4% 的多聚甲醛固定液。
- (3) 剥离小鼠脑组织并在 4 °C 固定 2 天。
- (4) 将脑组织放置在 30% 蔗糖中脱水至少 24 小时，然后进行石蜡包埋并在切片机上切出厚度 4 μ m 的切片。

2.2.17 免疫组化

- (1) 小鼠脑切片常规脱蜡并水化。
- (2) 3% H₂O₂ 室温灭活内源性酶 5 到 10 分钟，蒸馏水清洗切片。
- (3) 在 0.01M 的枸橼酸钠盐缓冲液中进行抗原修复，PBS 清洗切片。
- (4) 5% BSA 封闭液室温封闭 30 分钟。
- (5) 抗 RABV-P 的鼠源单抗作为一抗，在 4 °C 孵育过夜。
- (6) PBS 清洗切片，用偶联 HRP 的抗小鼠二抗在 37 °C 孵育 30 分钟。
- (7) PBS 清洗切片，DAB 室温显色。
- (8) 苏木素复染，脱水，透明，封片。
- (9) 显微镜进行观察拍照。

2.2.18 HE 染色

- (1) 小鼠脑切片常规脱蜡并使用逐级降浓度的酒精水化。
- (2) 切片用苏木素染色 5 分钟，用蒸馏水冲洗至灰蓝色，1% 盐酸处理数秒后再用蒸馏水冲洗。
- (3) 切片用伊红染色 3 分钟，用逐级升浓度的酒精脱水并用二甲苯透明化。
- (4) 用中性树胶封片后在显微镜下观察并拍照。

2.2.19 小鼠脑组织 cDNA 的获取

- (1) 将小鼠以颈椎脱臼方式处死，获取脑组织（约 100 mg），置于 1.5 ml EP 管中，加入 1 ml Trizol 试剂及小钢珠，利用组织匀浆仪打碎脑组织，室温静置 5 分钟，1000 rpm 离心 5 分钟，将上清转到新的 EP 管中。
- (2) 加入氯仿 200 μ l，充分混匀后，冰上静置 10 分钟。
- (3) 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 15 分钟，此时溶液分为三层，吸取上清液 450 μ l 至新的无 RNA 酶的 EP 管中，加入异丙醇 550 μ l，充分混匀，室温静置 10 分钟。
- (4) 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 5 分钟，充分弃掉上清，加入 75%无水乙醇（溶于 DEPC 水），室温静置 5 分钟。
- (5) 4 $^{\circ}$ C 7500 rpm 离心 5 分钟，弃去上清，在超净台中自然干燥 10 分钟，加入 50 μ l DEPC 水，充分溶解白色晶体，使用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。
- (6) 将提取的总 RNA 用 DEPC 水稀释到 200 ng/ μ l，使用 AMV 反转录酶，将提取的脑组织的总 RNA 反转录获得 cDNA，将 cDNA 样品于 -20 $^{\circ}$ C 贮存。

2.2.20 数据分析

本课题所涉及的数据处理和分析采用 GraphPad Prism 8.0 软件（GraphPad software, Inc, CA）。数据的差异分析选用的方法是 Student's t test。间接免疫荧光的平均荧光密度由 Image J 软件分析。小鼠脑组织免疫组化图片使用 Image J 软件的 IHC profile 插件进行阳性信号分析。生存曲线的分析，采用 log-rank（Mantel-Cox）检验。所有体内外实验设置至少 3 个重复样品，体外实验误差棒（Error bars）代表标准差（standard deviation, SD）；体内实验误差棒代表标准误差（standard error, SE），所有分析中差异的显著性表示方法为：*， $p < 0.05$ ；**， $p < 0.01$ ；***， $p < 0.001$ 。

第三章 结果

3.1 狂犬病病毒的感染引起细胞 LC3-II 水平升高

为了探究自噬在狂犬病病毒感染中发挥了何种功能。首先需要知道狂犬病病毒感染细胞后是否有自噬现象的出现。通过免疫印迹（western blotting, WB）来检测被 RABV（选择 CVS-B2c 毒株，以下统称为 RABV）感染的小鼠神经母细胞瘤细胞 N2a 中的内源性 LC3-II 的蛋白水平。LC3 蛋白有两种存在形式，LC3-I 和 LC3-II，自噬发生时 LC3-I 会被切割加工转变成 LC3-II，因此 LC3-II 蛋白的量可以用来衡量细胞的自噬水平。LC3-II 和内参蛋白的量的比较则是鉴定自噬水平的经典指标之一。WB 结果显示以 0.01 感染复数（Multiplicity of infection, MOI）的 RABV 病毒剂量感染的 N2a 细胞在感染后 24 小时开始出现较为显著的 LC3-II 蛋白水平的增强，且感染后 36 小时仍保持着该表型，LC3-II/GAPDH 比值则随着时间增长而升高（图 3-1），这暗示着 RABV 感染增强了细胞的自噬水平。

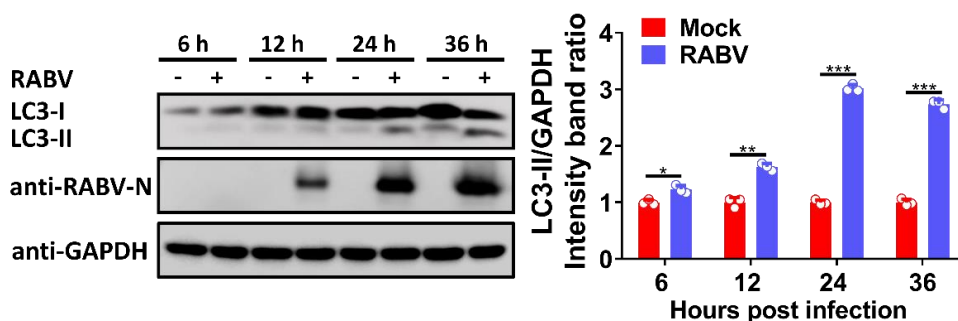


图 3-1 RABV 感染 N2a 细胞后对 LC3 水平的影响 (n=3)

Fig. 3-1 Effect of RABV infection of N2a cells on LC3 levels (n=3)

3.2 狂犬病病毒的感染引起 GFP-LC3 点状聚集

为了更直观的确定狂犬病病毒感染对自噬的影响，将 GFP-LC3 真核表达质粒转染进细胞中，表达的 GFP-LC3 在自噬发生时被招募到自噬体膜上会发生点状聚集，这一现象可被荧光显微镜观察到，对拍摄到的荧光图片中点状聚集的计数可以部分反映出细胞自噬水平的强弱。对转染了 GFP-LC3 质粒的 N2a 细胞进行 MOI=0.01 的 RABV 的感染，并使用激光共聚焦显微镜对染毒 36 小时的活细胞进行了观察并照相，然后将得到的多层共聚焦图片进行了 3D 重构，最

终得到的 3D 图片如图 3-2 所示, RABV 感染组的细胞中呈现大量的 GFP-LC3 点状聚集, 这说明在 RABV 感染下, 细胞自噬小体累积数量上升。

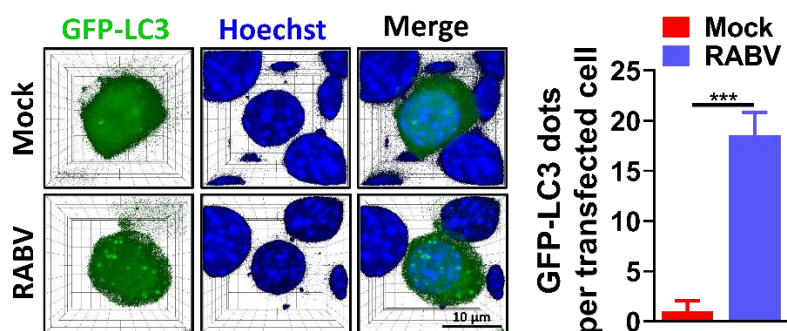


图 3-2 RABV 感染 N2a 细胞后对 GFP-LC3 的影响 (标尺=10 μ m, n=50)

Fig. 3-2 Effect of RABV infection of N2a cells on GFP-LC3 (Scale bar=10 μ m, n=50)

3.3 狂犬病病毒的感染引起内源性 LC3 的点状聚集

同时, 对 MOI=0.01 的 RABV 感染 36 小时后的 N2a 细胞中的内源性 LC3 和 RABV 的 N 蛋白进行成像, 并对多层的共聚焦图片进行 3D 重构。最终得到的 3D 图片如图 3-3 所示, RABV 感染的 N2a 细胞中呈现大量内源性 LC3 的块状聚集, 而未感染 (Mock 组) 细胞中的内源性 LC3 呈散点状分布。这一结果说明 RABV 的感染可以诱发细胞自噬小体的累积。

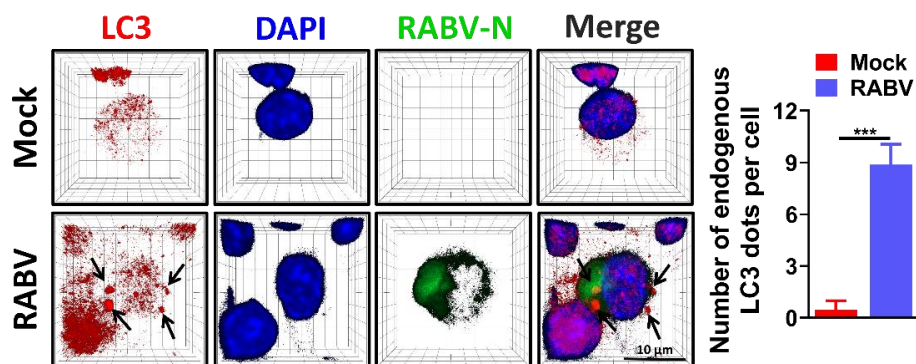


图 3-3 RABV 感染 N2a 细胞后对内源性 LC3 的影响 (标尺=10 μ m, n=50)

Fig. 3-3 Effect of RABV infection of N2a cells on endogenous LC3 (Scale bar=10 μ m, n=50)

3.4 狂犬病病毒的感染引起自噬小体的累积

接下来, 对 MOI=0.01 的 RABV 感染 36 小时后的 N2a 细胞使用透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM) 进行观察, 拍摄得到的图片如图 3-4 所示, 白色箭头指示 RABV 病毒粒子, 白框指示进一步放大的区域。

RABV 感染的 N2a 细胞中呈现出大量单层膜或者双层膜的自噬小体结构。该结果同样暗示着 RABV 的感染可以诱发细胞自噬小体的累积。

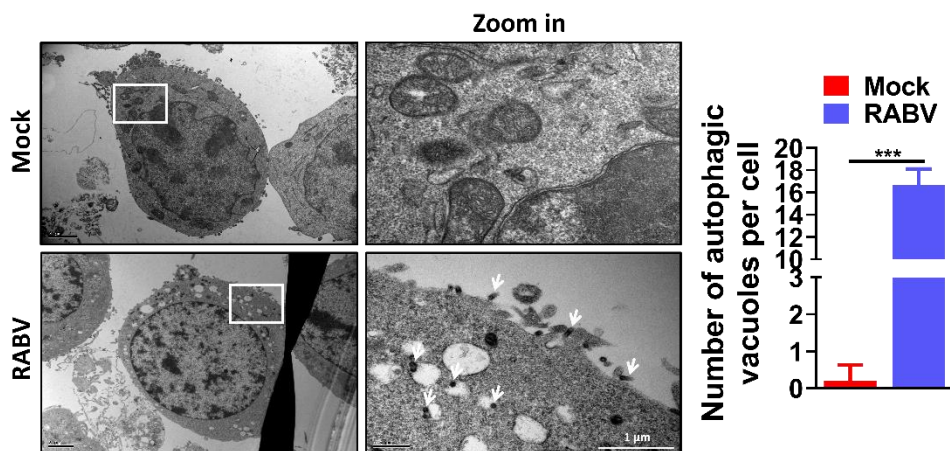


图 3-4 RABV 感染 N2a 细胞后对细胞内自噬小体的影响 (标尺=1 μm , n=10)

Fig. 3-4 Effect of RABV infection of N2a cells on cellular autophagosomes (Scale bar=1 μm , n=10)

3.5 狂犬病病毒的复制受到细胞自噬水平的调控

为了研究自噬对于 RABV 复制周期的影响, 我们使用透射电子显微镜观察了在自噬抑制剂 3-MA 处理下感染 RABV 的 N2a 细胞。结果如图 3-5 所示, 白色箭头指示 RABV 病毒粒子, 白框指示进一步放大的区域。自噬抑制剂 3-MA 处理下的 RABV 大部分聚集在细胞质中, 而空白处理组中大多数病毒颗粒集中在细胞膜外。该结果说明狂犬病病毒的复制确实受到细胞自噬水平的调控, 且暗示着 RABV 的出芽可能受到细胞自噬过程的影响。

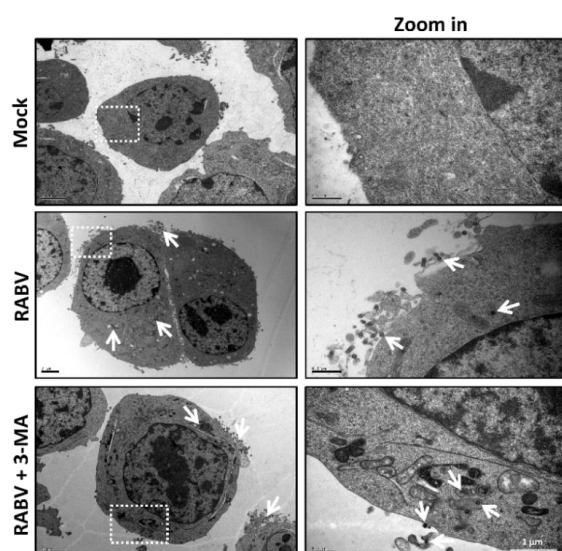


图 3-5 细胞自噬水平对于 RABV 分布的影响 (标尺=1 μm)

Fig. 3-5 Effect of cellular autophagy levels on RABV distribution (Scale bar=1 μm)

3.6 狂犬病病毒的 M 蛋白和 P 蛋白均可以引起自噬

接下来为了确认引起细胞自噬的是 RABV 的哪一个结构蛋白，将 RABV 的 4 个结构蛋白：N，P，M 和 G 构建进真核表达质粒载体 pCAGGS 中并分别将这些病毒蛋白表达质粒转染进 N2a 细胞中。WB 结果如图 3-6 A 所示，显示出 P 蛋白和 M 蛋白的过表达均可以显著增加细胞内 LC3-II 的水平并使得 LC3-II/GAPDH 的比值上升。进一步我们分别将这些病毒蛋白表达质粒和 GFP-LC3 表达质粒共转染进 N2a 细胞并使用激光共聚焦显微镜进行观察，得到的图片如图 3-6 B 所示，P 蛋白和 M 蛋白的过表达均可以引起 GFP-LC3 的点状聚集，且 M 蛋白过表达引起 GFP-LC3 点状聚集的现象更为明显。另外我们发现 GFP-LC3 的点状聚集和 M 蛋白存在着共定位现象，而该现象并未在 P 蛋白过表达组中出现。该结果暗示着 M 蛋白可能直接参与了细胞自噬的发生。

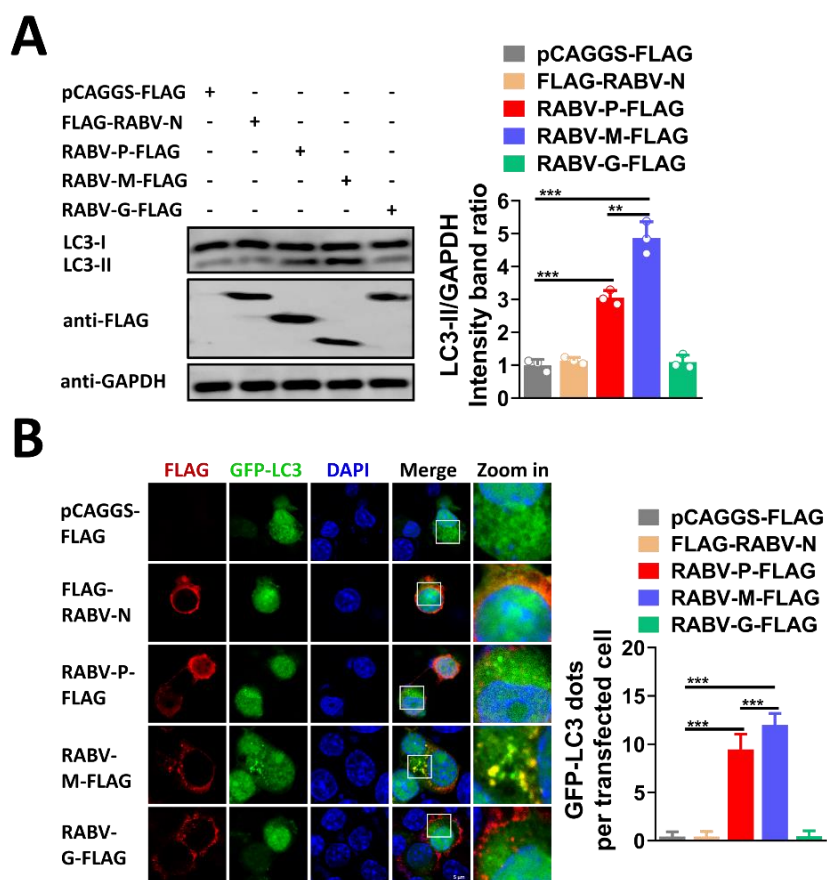


图 3-6 RABV 各结构蛋白对自噬的影响

Fig. 3-6 Effect of RABV structural proteins on autophagy

A: RABV 各结构蛋白对细胞内源性 LC3 水平的影响 (n=3)

A: Effect of each structural protein of RABV on the level of endogenous LC3 in cells (n=3)

B: RABV 各结构蛋白对 GFP-LC3 的影响 (标尺=5 μm , n=50)

B: Effect of each structural protein of RABV on GFP-LC3 (Scale bar=5 μm , n=50)

3.7 M 蛋白引起细胞中自噬小体的累积

接下来, 对转染了 pCAGGS-RABV-M 的 N2a 细胞使用透射电子显微镜进行观察, 拍摄得到的图片如图 3-7 所示, 过表达 M 蛋白组的 N2a 细胞中呈现出大量单层膜或者双层膜的自噬小体结构。该结果暗示着 RABV 的 M 蛋白可以引起细胞自噬小体的累积。

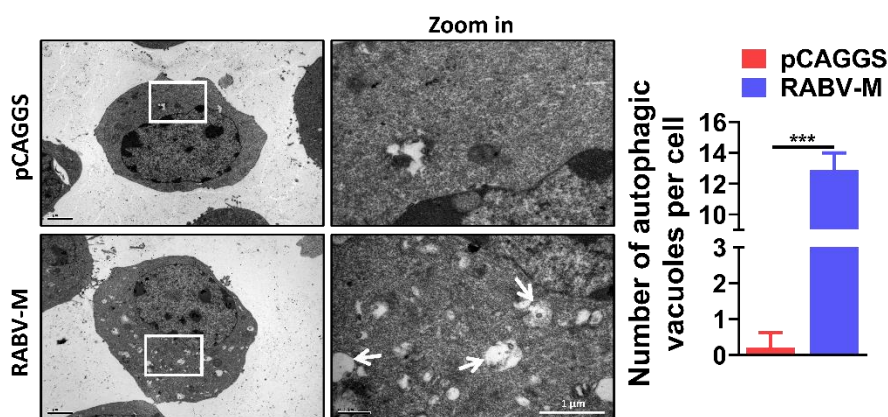


图 3-7 RABV 的 M 蛋白对于细胞自噬小体的影响 (标尺=1 μm , n=10)

Fig. 3-7 Effects of RABV-M protein on cellular autophagosomes (Scale bar=1 μm , n=10)

3.8 M 蛋白可以在 SK-N-SH 细胞中引起自噬

由于 RABV 的 P 蛋白引起自噬发生的机制已经被探索过(Liu et al. 2017), 且 M 蛋白存在和 GFP-LC3 共定位的现象, 因此选择了 M 蛋白进行进一步研究。同时为了防止细胞特异性影响, 使用人类神经母细胞瘤细胞 SK-N-SH 并检测了其在 M 蛋白过表达或在雷帕霉素 (Rapamycin) 这一经典的自噬刺激物处理下 (1 μM , 24 h) 的自噬水平的变化。WB 结果如图 3-8 A 所示, M 蛋白过表达或者 Rapamycin 刺激的 SK-N-SH 细胞的 LC3-II 蛋白水平及 LC3-II/GAPDH 比值显著增加。进一步我们将 M 蛋白表达质粒和 GFP-LC3 表达质粒共转染进 SK-N-SH 细胞并使用激光共聚焦显微镜进行观察, 得到的图片如图 3-8 B 所示, M 蛋白的过表达可以引起 GFP-LC3 的点状聚集, 作为阳性对照的 Rapamycin 处理组同样呈现出大量 GFP-LC3 点状聚集现象, 且 M 蛋白过表达组的图片显示

GFP-LC3 的点状聚集和 M 蛋白存在着共定位现象, 和在 N2a 细胞中观察到的现象一致 (图 3-6 B)。综合上述结果我们可以得出 RABV 的 M 蛋白的单独过表达可以引起细胞的自噬发生。

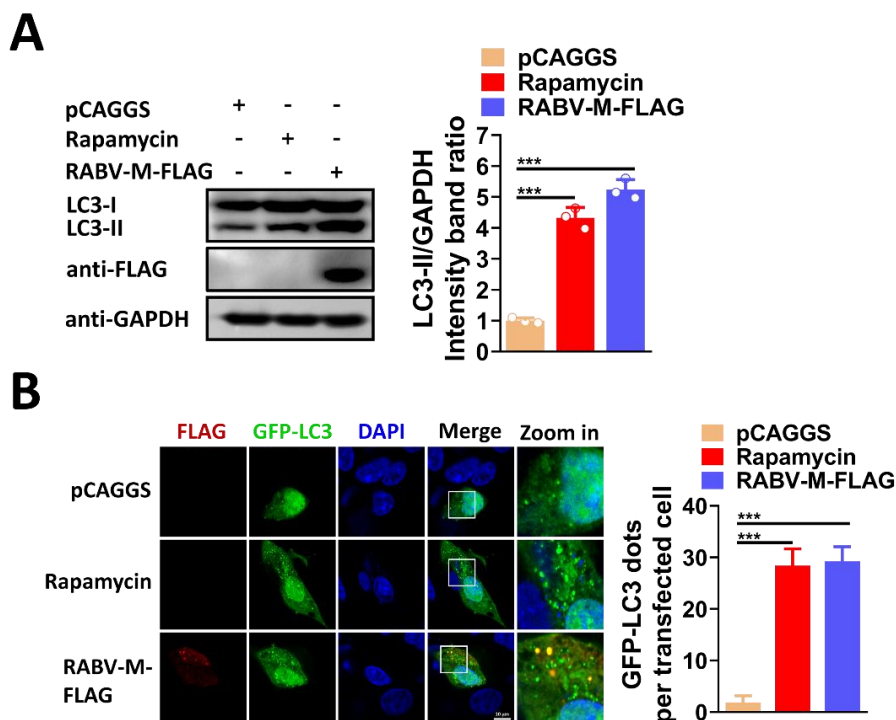


图 3-8 RABV 的 M 蛋白对 SK-N-SH 细胞的自噬的影响

Fig. 3-8 Effect of the M protein of RABV on autophagy in SK-N-SH cells

A: M 蛋白对 SK-N-SH 细胞内源性 LC3 水平的影响 (n=3)

A: Effect of M protein on endogenous LC3 levels in SK-N-SH cells (n=3)

B: M 蛋白对 SK-N-SH 细胞中 GFP-LC3 的影响 (标尺=10 μ m, n=50)

B: Effect of M protein on GFP-LC3 in SK-N-SH cells (Scale bar=10 μ m, n=50)

3.9 M 蛋白与 LC3 存在互作且互作水平与 M 蛋白的泛素化相关

共聚焦显微镜观察到 GFP-LC3 的点状聚集和 M 蛋白存在共定位现象, 这暗示着 M 蛋白可能和自噬小体上的蛋白存在互作。于是在 N2a 细胞中进行了 GFP-LC3 和 M-FLAG 的过表达, 并用免疫共沉淀实验证明了 GFP-LC3 与 M-FLAG 存在相互作用 (图 3-9 A)。考虑到泛素化修饰在自噬发生中发挥的重要作用, 且已有研究确认狂犬病病毒的 M 蛋白的第 60 位氨基酸可以被泛素化修饰(Cai et al. 2020), 接下来我们探究了 M 蛋白的泛素化修饰是否影响到 LC3 和 M 的互作。为了排除可能存在的 GFP 对互作的影响, 我们构建了 HA-LC3 的表达质粒并用于接下来一系列的免疫共沉淀实验中。首先使用了 E1 泛素酶抑制

剂：PYZD-4409 去处理转染了 HA-LC3 表达质粒和 M-FLAG 表达质粒的 N2a 细胞，免疫共沉淀结果显示在泛素激活酶 E1 被抑制时，HA-LC3 与 M-FLAG 的互作水平下降但未完全消失（图 3-9 B）。

接着构建了 M 蛋白第 60 位赖氨酸突变成精氨酸的表达质粒 M-K60R-FLAG 并确认了 M 蛋白第 60 位氨基酸突变后会导致 M 蛋白被泛素化水平的显著降低（图 3-9 C），这说明 M 蛋白的第 60 位氨基酸确实可被泛素化修饰。接着我们将 M-K60R-FLAG 和 HA-LC3 共表达在 N2a 细胞中，免疫共沉淀结果显示 M-K60R-FLAG 与 HA-LC3 的互作水平下降但未完全消失（图 3-9 D），这与我们使用 E1 泛素酶抑制剂得到的结果相一致。上述结果说明 M 蛋白的泛素化水平影响到了 M 蛋白与 LC3 的互作。

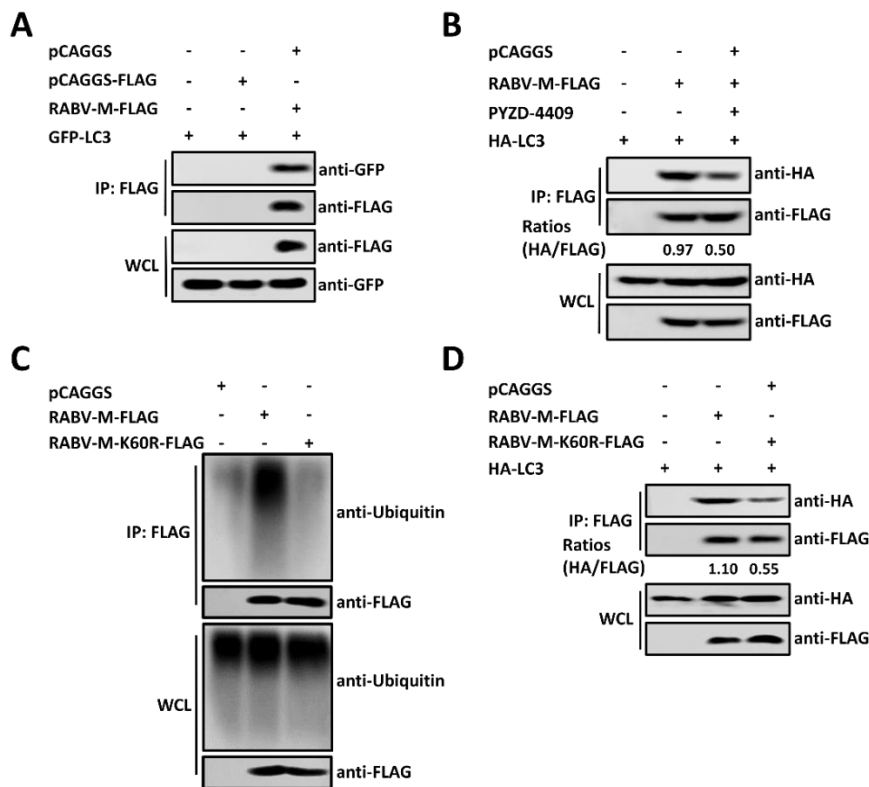


图 3-9 M 蛋白及不被泛素化的 M 蛋白与 LC3 的互作

Fig. 3-9 Interaction of M protein and M protein that are not ubiquitinated with LC3

A: M 蛋白与 GFP-LC3 的互作

A: Interaction of M protein with GFP-LC3

B: PYZD-4409 处理下 M 蛋白与 HA-LC3 的互作水平

B: Interaction levels of M protein and HA-LC3 under PYZD-4409 treatment

C: M-K60R 突变体的泛素化水平

C: Levels of ubiquitination in the M-K60R mutant

D: M-K60R 蛋白与 HA-LC3 的互作水平

D: Interaction levels of M-K60R protein and HA-LC3

3.10 无法被泛素化的突变 M 蛋白引起自噬的水平降低

上述研究结果发现 LC3 与 M-K60R 的互作水平相较于野生型 M 来说发生了明显的下降（图 3-9 D）。为了探究 M 和 LC3 的互作对自噬发生的影响，进而检测并比较了 M-K60R 和 M 的表达对自噬的影响。如图 3-10 A 所示，WB 结果显示表达 M 蛋白或 M-K60R 蛋白的 N2a 细胞的 LC3-II 蛋白水平及 LC3-II/GAPDH 比值均比空白对照组显著上升，且野生型 M 蛋白上调 LC3-II 的水平及 LC3-II/GAPDH 比值高于 M-K60R 蛋白。接着将 M 和 M-K60R 蛋白表达质粒与 GFP-LC3 表达质粒共转染进 N2a 细胞并使用激光共聚焦显微镜进行观察，如图 3-10 B 所示，M 蛋白的过表达可以引起 GFP-LC3 的点状聚集，而 M-K60R 引起的 GFP-LC3 的点状聚集现象显著弱于野生型 M，同时我们可以观察到 M 与 LC3 存在明显的共定位现象而 M-K60R 不存在该现象。以上结果说明在 N2a 细胞中，M-K60R 引起细胞自噬发生的能力相较于 M 来说发生了显著的下降。

为了防止细胞特异性影响，接着使用 SK-N-SH 细胞并检测了其在 M 蛋白或 M-K60R 蛋白过表达下的自噬水平的变化。如图 3-10 C 所示，WB 结果显示表达 M 蛋白或 M-K60R 蛋白的 SK-N-SH 细胞的 LC3-II 蛋白水平及 LC3-II/GAPDH 比值均比空白对照组显著上升，且野生型 M 蛋白上调 LC3-II 的水平及 LC3-II/GAPDH 比值高于 M-K60R 蛋白。进一步我们将 M 和 M-K60R 蛋白表达质粒与 GFP-LC3 表达质粒共转染进 SK-N-SH 细胞并使用激光共聚焦显微镜进行观察，如图 3-10 D 所示，M 蛋白的过表达可以引起 GFP-LC3 的点状聚集，而 M-K60R 引起的 GFP-LC3 的点状聚集现象显著弱于野生型 M。综合以上结果我们可以得出 M-K60R 引起细胞自噬发生的能力相较于 M 来说发生了减弱，该现象与 M-K60R 与 LC3 的互作水平的降低相关。

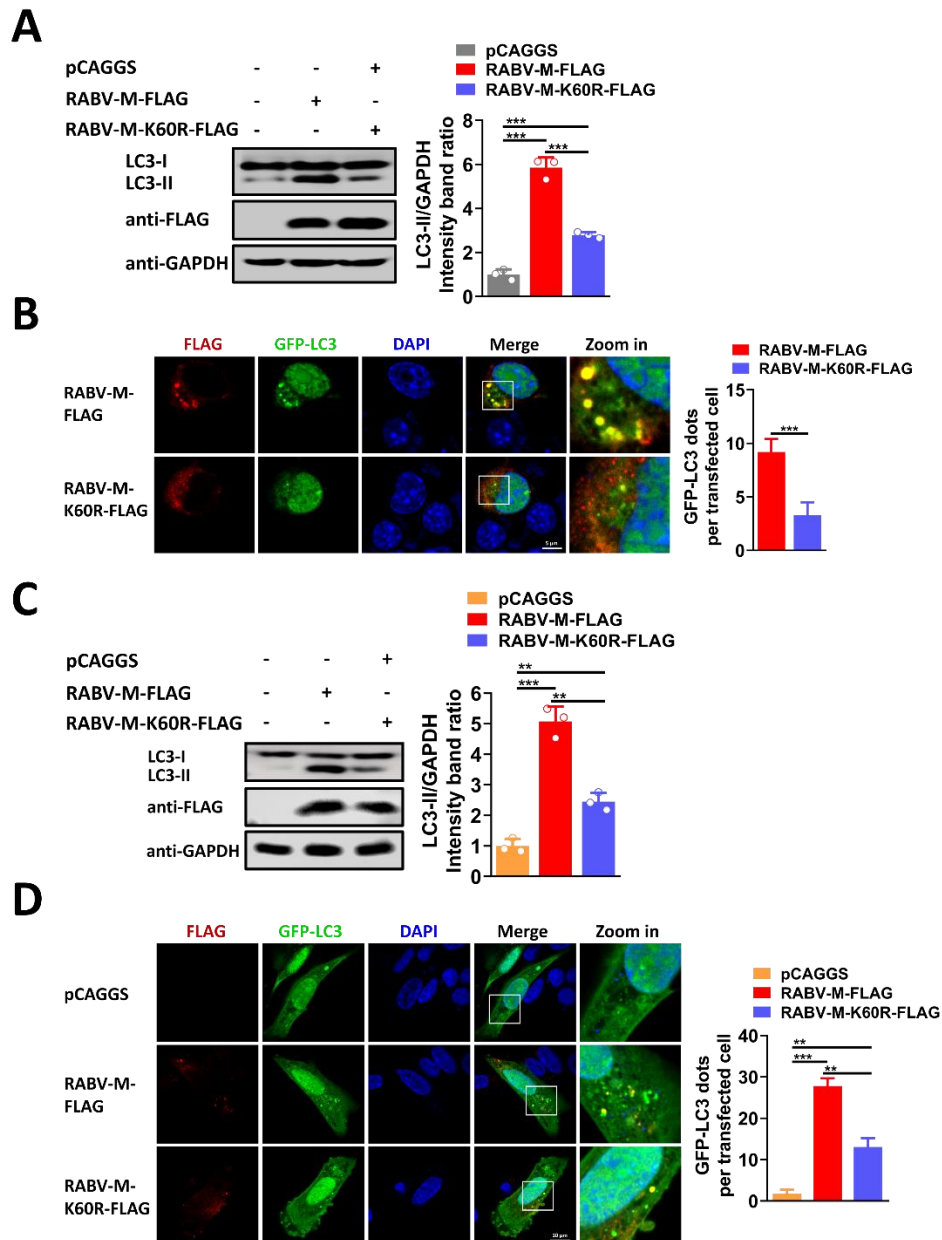


图 3-10 M 蛋白及 M-K60R 突变体蛋白引起的自噬水平

Fig. 3-10 Levels of autophagy induced by M protein and M-K60R protein

A: N2a 细胞中 M 蛋白及 M-K60R 突变体蛋白引起的自噬水平 (n=3)

A: Levels of autophagy induced by M protein and M-K60R protein in N2a cells (n=3)

B: N2a 细胞中 M 蛋白及 M-K60R 突变体蛋白对 GFP-LC3 的影响 (标尺=5 μ m, n=50)

B: Effect of M protein and M-K60R protein on GFP-LC3 in N2a cells (Scale bar=5 μ m, n=50)

C: SK-N-SH 细胞中 M 蛋白及 M-K60R 突变体蛋白引起的自噬水平 (n=3)

C: Levels of autophagy induced by M protein and M-K60R protein in SK-N-SH cells (n=3)

D: SK-N-SH 细胞中 M 蛋白及 M-K60R 突变体蛋白对 GFP-LC3 的影响 (标尺=10 μ m, n=50)

D: Effect of M protein and M-K60R protein on GFP-LC3 in SK-N-SH cells (Scale bar=10 μ m, n=50)

3.11 Nedd4 与 M 蛋白直接互作并可以泛素化 M 蛋白

考虑到 M 蛋白的泛素化修饰也影响到 M 蛋白所引起的自噬水平。接下来我们想探究是哪个蛋白发挥了泛素化 M 蛋白的作用。已经有报道指出 RABV-M 的 PPxY 结构域可以和含有 WW 结构域的酵母中的 Nedd4 蛋白互作(Harty et al. 2001)。为了探究 Nedd4 是否可以泛素化 M 蛋白。首先将 N 端带有 HA-tag 的 Nedd4 构建进真核表达载体 pCAGGS 中, 然后将 HA-Nedd4 质粒转染进 N2a 细胞, 细胞裂解液与原核表达并纯化的 GST 及 GST-M 进行混合孵育, 原核 GST pull-down 的结果显示 GST-M 与 Nedd4 直接互作(图 3-11 A)。

接着我们将 M 蛋白的 PPxY 结构域突变为 APxY 并构建进真核表达载体, 命名为 M-APxY-FLAG, PPxY 结构域中的第一位脯氨酸突变为丙氨酸已被证明可以破坏掉 PPxY 结构域和 WW 结构域的互作(Harty et al. 1999)。在 N2a 中进行了 HA-Nedd4 和 M-FLAG, M-K60R-FLAG, M-APxY-FLAG 的过表达并使用免疫共沉淀确认了 M-APxY-FLAG 不再与 Nedd4 互作(图 3-11 B)。同时, 在 N2a 中进行了 HA-Nedd4 和 M-FLAG, M-K60R-FLAG, M-APxY-FLAG 的过表达并使用 Nedd4 多抗定位了 N2a 细胞的内源性 Nedd4, 然后在激光共聚焦显微镜下观察, 结果显示 M-FLAG 和 M-K60R-FLAG 与内源性 Nedd4 存在明显的共定位现象, 而 M-APxY-FLAG 组中则没有发现该现象(图 3-11 C)。

为了确认 Nedd4 是否发挥了泛素化 M 蛋白的作用, 使用合成的 siRNA 对 N2a 细胞中的 Nedd4 进行了敲低, 在使用荧光定量 PCR (qPCR) 和 WB 实验确定了针对 Nedd4 的 siRNA 的有效性后, 选择了第 2 号 RNAi 引物对 (No. 2) 进行后续的实验(图 3-11 D)。在敲低 Nedd4 的 N2a 中检测了 M 蛋白的泛素化水平, 免疫共沉淀结果显示 M 蛋白的泛素化水平在 Nedd4 敲低的情况下发生的明显的下降(图 3-11 E)。这些结果暗示着 Nedd4 与 M 蛋白的 PPxY 结构域存在相互作用且 N2a 细胞中的 Nedd4 具备泛素化 M 蛋白的功能。

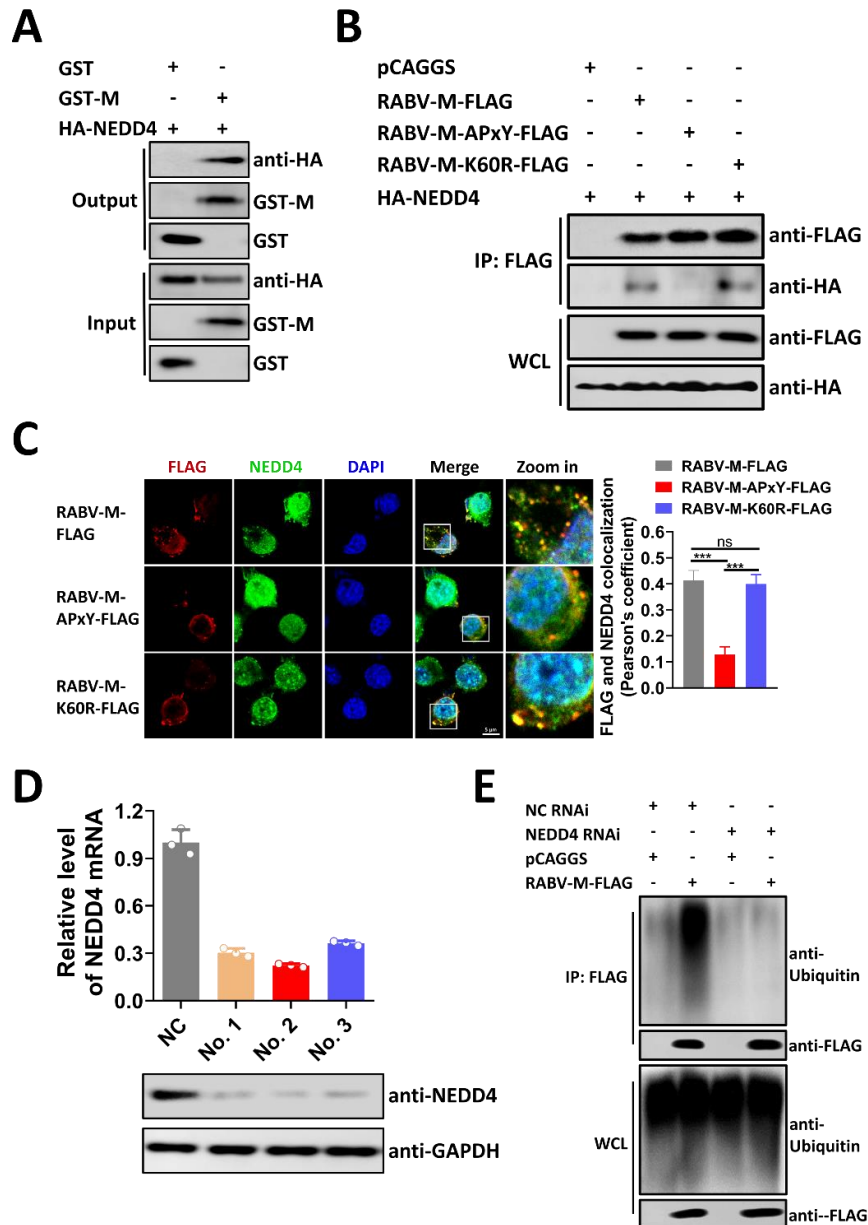


图 3-11 Nedd4 与 M 蛋白的互作及 Nedd4 对 M 蛋白的泛素化修饰

Fig. 3-11 Interaction of Nedd4 with M protein and ubiquitination modification of M protein by Nedd4

A: 大肠杆菌表达并纯化的 GST 及 GST-M 与 HA-Nedd4 的互作

A: Interaction of GST and GST-M expressed and purified by Escherichia coli with HA-Nedd4

B: M 野生型, M-APxY 突变体, M-K60R 突变体与 HA-Nedd4 的互作水平

B: Interaction levels of M wild type, M-APxY mutant, M-K60R mutant and HA-Nedd4

C: M 野生型, M-APxY 突变体, M-K60R 突变体与内源性 Nedd4 的共定位 (标尺=5 μ m, n=30)

C: Co-localization levels of M wild type, M-APxY mutant, M-K60R mutant and endogenous Nedd4 (Scale bar=5 μ m, n=30)

D: 针对 Nedd4 的 siRNAs 的作用效率 (n=3)

D: Efficiency of siRNAs targeting Nedd4 (n=3)

E: Nedd4 敲低下 M 蛋白的泛素化水平

E: Ubiquitination levels of M protein under Nedd4 knockdown

3.12 Nedd4 调控 M 蛋白或狂犬病毒引起的自噬

接着探究了 Nedd4 对 M 蛋白及 RABV 感染所引起的细胞自噬的影响。在 Nedd4 敲低的情况下，WB 结果显示 M 蛋白不再可以引起 LC3-II 蛋白水平上升（图 3-12 A）。在 Nedd4 敲低的情况下对 N2a 进行了 MOI=0.01 的 RABV 的感染并在感染后 24 小时收蛋白样，WB 结果显示在 Nedd4 敲低情况下，RABV 的感染不再使得 LC3-II 蛋白水平上升（图 3-12 B）。这些高度一致的结果暗示着 Nedd4 蛋白在 M 蛋白及 RABV 感染过程中所引起的细胞自噬中发挥着关键作用。

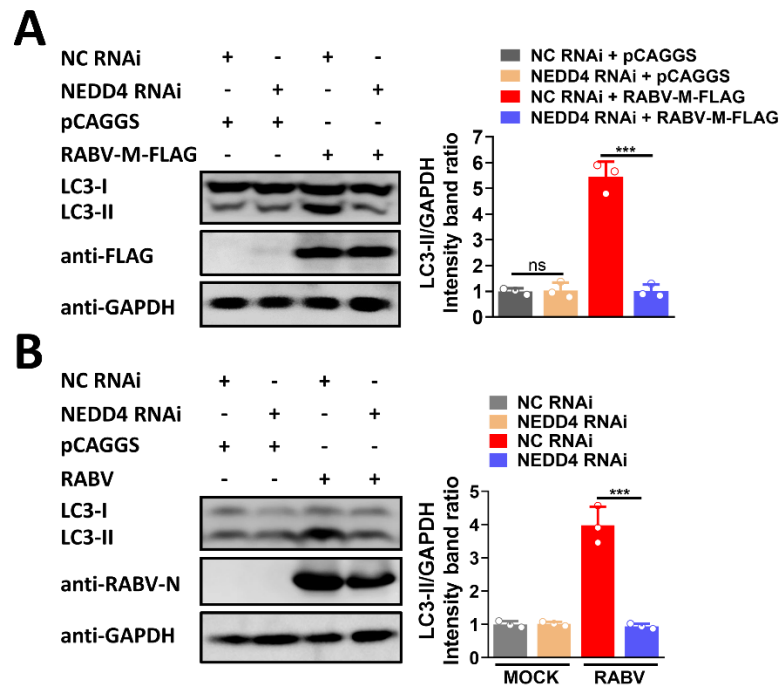


图 3-12 Nedd4 敲低对 M 蛋白或 RABV 感染所引起的自噬的影响

Fig. 3-12 Effect of Nedd4 knockdown on autophagy induced by M protein or RABV infection

A: Nedd4 敲低对 M 蛋白引起的自噬水平的影响 (n=3)

A: Effect of Nedd4 knockdown on the level of M protein-induced autophagy (n=3)

B: Nedd4 敲低对 RABV 感染引起的自噬水平的影响 (n=3)

B: Effect of Nedd4 knockdown on the level of autophagy induced by RABV infection (n=3)

3.13 不与 Nedd4 互作的 M 突变蛋白无法引起自噬

由于 M-APxY 丧失了与 Nedd4 的相互作用，接下来对 M-APxY 在细胞自噬发生上的影响进行了一系列实验。首先在 N2a 细胞中进行了 HA-LC3 和 M-FLAG 及其突变体的过表达，使用免疫共沉淀检测 M-FLAG 及其突变体与 HA-LC3 互作的水平（图 3-13 A），结果显示野生型 M 与 LC3 的互作最强，M-K60R 与 LC3 的互作减弱，而 M-APxY 与 LC3 的互作基本消失。接着在 N2a 细胞中进行了 M-FLAG 及 M-APxY-FLAG 的过表达并检测了它们对自噬的影响。WB 结果显示表达 M 蛋白的 N2a 细胞的 LC3-II 蛋白水平及 LC3-II/GAPDH 比值相比于空白对照组显著上升，且 M-APxY 蛋白无法上调 LC3-II 的水平，其 LC3-II/GAPDH 比值与空白对照组一致（图 3-13 B）。

同时，为了防止细胞特异性影响，我们也在 SK-N-SH 细胞中进行了 M-FLAG 及 M-APxY-FLAG 的过表达并检测了它们对自噬的影响。WB 结果显示表达 M 蛋白的 SK-N-SH 细胞的 LC3-II 蛋白水平及 LC3-II/GAPDH 比值相比于空白对照组显著上升，且 M-APxY 蛋白无法上调 LC3-II 的水平，其 LC3-II/GAPDH 比值与空白对照组一致（图 3-13 C）。接着将 M 和 M-APxY 蛋白表达质粒与 GFP-LC3 表达质粒共转染进 SK-N-SH 细胞，然后使用激光共聚焦显微镜进行观察，图片结果显示 M 蛋白的过表达可以引起 GFP-LC3 的点状聚集，而 M-APxY 不引起 GFP-LC3 的点状聚集现象（图 3-13 D）。上述结果说明 M-APxY 无法与 LC3 互作，无法引起细胞自噬。

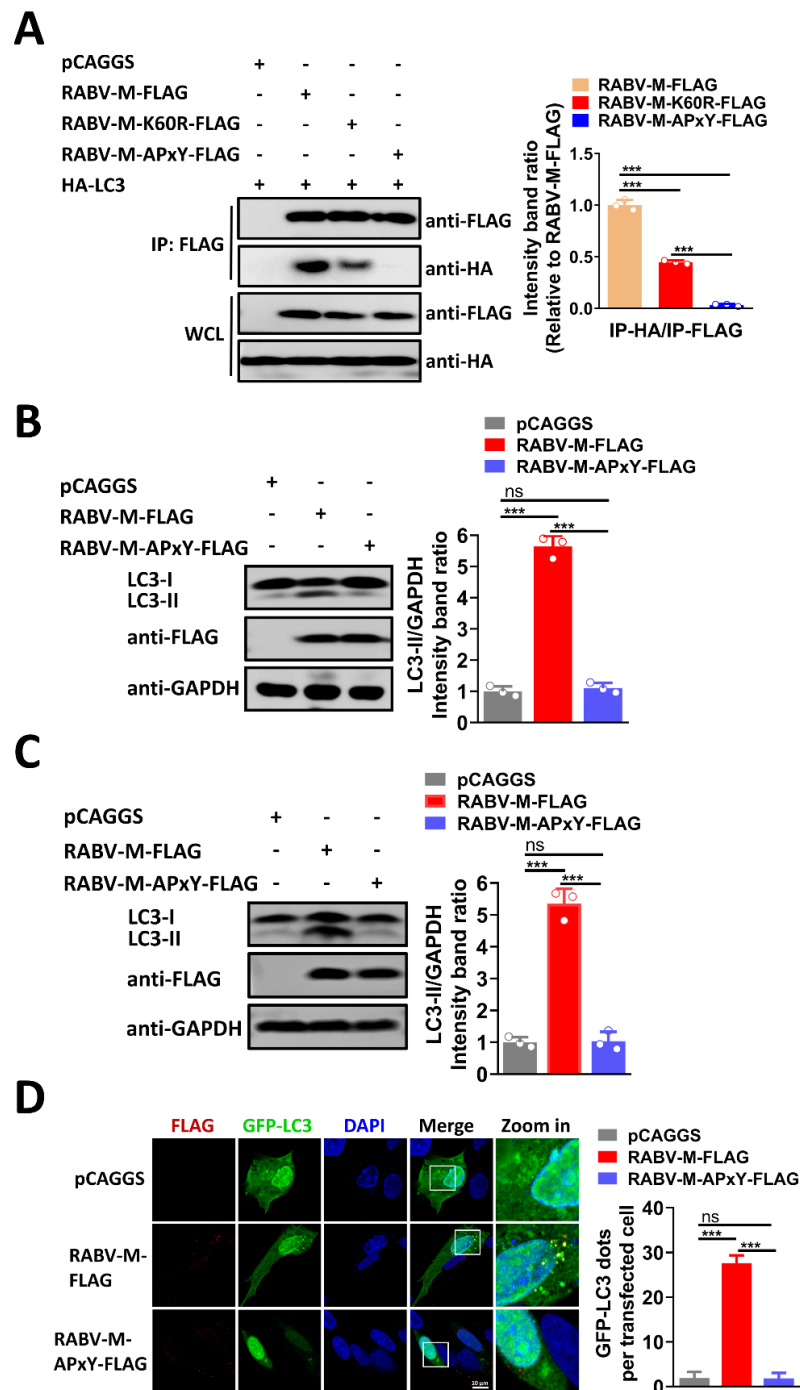


图 3-13 不与 Nedd4 互作的 M-APxY 突变体对自噬的影响

Fig. 3-13 Effect of M-APxY mutants that do not interact with Nedd4 on autophagy

A: M 野生型, M-APxY 突变体, M-K60R 突变体与 HA-LC3 的互作水平 (n=3)

A: Interaction levels of M wild type, M-APxY mutant, M-K60R mutant and HA-LC3 (n=3)

B: N2a 细胞中 M-APxY 突变体引起的自噬水平 (n=3)

B Levels of autophagy induced by M-APxY mutant in N2a cells (n=3)

C: SK-N-SH 细胞中 M-APxY 突变体引起的自噬水平 (n=3)

C: Levels of autophagy induced by M-APxY mutants in SK-N-SH cells (n=3)

D: SK-N-SH 细胞中 M-APxY 突变体对 GFP-LC3 的影响 (标尺=10 μ m, n=50)D: Effect of M-APxY mutant on GFP-LC3 in SK-N-SH cells (Scale bar=10 μ m, n=50)

3.14 Nedd4 调控 M 与 LC3 的互作

上述研究结果表明 M 和 M-K60R 均可以引起自噬的发生，且 M-K60R 引起的自噬水平弱于野生型 M，而 M-APxY 则无法引起自噬发生。这与免疫共沉淀结果相一致，即 M-K60R 和 LC3 的互作弱于野生型 M 和 LC3，而 M-APxY 则不再与 LC3 互作。由于 Nedd4 在 M 所引起的细胞自噬上发挥关键作用，且 Nedd4 不与 M-APxY 互作而保留了与野生型 M 和 M-K60R 互作的能力。这些结果让我们推测 Nedd4 可能介导了 M 蛋白和 LC3 的互作并引起自噬发生。于是我们在 Nedd4 敲低情况下检测了 M-FLAG 和 HA-LC3 的互作水平。如图 3-14 所示，免疫共沉淀结果显示在 Nedd4 敲低后 M-FLAG 无法和 HA-LC3 互作。这暗示着 Nedd4 直接参与了 M 和 LC3 的互作，由于已经证明 M 和 LC3 的互作是间接的，所以 Nedd4 可能承担着 M 和 LC3 互作中的桥梁作用。

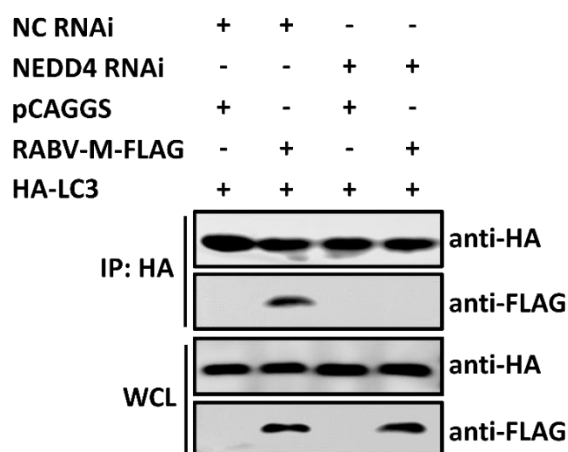


图 3-14 Nedd4 敲低对 M 蛋白与 HA-LC3 的互作的影响

Fig. 3-14 Effect of Nedd4 knockdown on the interaction of M protein with HA-LC3

3.15 Nedd4 在 M 蛋白存在时结合内源性 LC3 的能力增强

已有报道证明人源 Nedd4 本体具有可工作的 LC3 结合结构域（LC3-interacting region, LIR）。为了确认针对 M 蛋白研究中的鼠源 Nedd4 是否也发挥着结合 LC3 的作用。首先将 HA-Nedd4 表达质粒转染进 N2a 细胞中并测试了其在 M-FLAG 表达或不表达情况下结合内源性 LC3 的水平。如图 3-15 所示，免疫共沉淀的结果显示 HA-Nedd4 本体可以结合部分的内源性 LC3，且在 M-FLAG 存在时，HA-Nedd4 结合内源性 LC3 的能力得到了明显的提升。这暗示着 Nedd4 在 M-FLAG 存在情况下可以结合更多的 LC3。

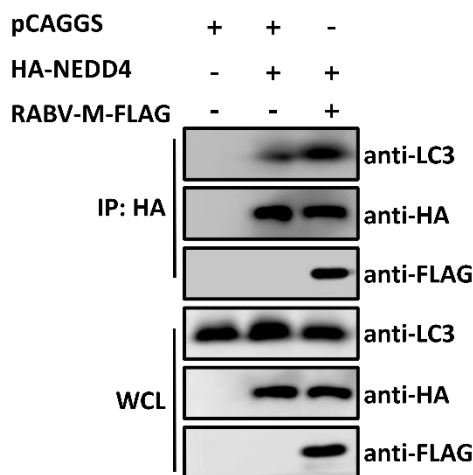


图 3-15 M 蛋白对 Nedd4 结合内源性 LC3 的影响

Fig. 3-15 Effect of M protein on Nedd4 binding to endogenous LC3

3.16 鼠源 Nedd4 的第 2 个 LIR 基序可以结合内源性 LC3

人源和鼠源的 Nedd4 的预测 LIR 及其周围的氨基酸序列高度一致（图 3-16 A）。且已有报道证明人源 Nedd4 的第 2 号 LIR（LIR-2）具有结合 LC3 的功能 (Qiu et al. 2017)。为了确认鼠源 Nedd4 中发挥 LIR 功能的区域，将预测出的各个 LIR 基序的第一位色氨酸突变成丙氨酸使其失去结合 LC3 的能力，并将其 N 端加上 HA-tag 并构建进真核表达载体 pCAGGS 中（HA-Nedd4-LIRm-1, HA-Nedd4-LIRm-2, HA-Nedd4-LIRm-3, HA-Nedd4-LIRm-4）。接着将这些 Nedd4 突变体质粒和野生型 Nedd4 质粒（HA-Nedd4-WT）转染进 N2a 细胞并测试了这些 Nedd4 突变体结合内源性 LC3 的能力，如图 3-16 B 所示，免疫共沉淀结果显示仅有 HA-Nedd4-LIRm-2 失去和内源性 LC3 互作的能力，这说明鼠源 Nedd4 的第 2 个 LIR 基序有着结合 LC3 的作用，这与人源 Nedd4 的第 2 个 LIR 基序可结合 LC3 的报道相一致(Qiu et al. 2017)。



图 3-16 鼠源 Nedd4 的各个 LIR 基序与 LC3 的结合能力

Fig. 3-16 Binding ability of individual LIR motifs of murine-derived Nedd4 to LC3

A: 人源 Nedd4 和鼠源 Nedd4 的氨基酸序列比对

A: Amino acid sequence comparison of human Nedd4 and mouse Nedd4

B: 鼠源 Nedd4 的各个 LIR 突变体结合内源性 LC3 的水平

B: Interaction levels between individual LIR mutants of mouse Nedd4 and endogenous LC3

3.17 鼠源 Nedd4 的第 2、3 个 LIR 基序均可以在 M 蛋白的存在下结合 LC3

已有结果表明鼠源 Nedd4 可以在 M-FLAG 存在情况下结合更多的 LC3 (图 3-15), 这说明可能在 M 存在情况下有别的 LIR 基序参与结合 LC3。为了探究是否有别的 LIR 基序参与到 Nedd4 和 LC3 的互作之中, 首先在 M-FLAG 表达的 N2a 细胞中检测了 HA-Nedd4 及其 4 个 LIR 基序突变体结合内源性 LC3 的水平, 如图 3-17 A 所示, 免疫共沉淀结果显示 HA-Nedd4-LIRm-2 和 HA-Nedd4-LIRm-3 结合 LC3 的能力相较于 HA-Nedd4 野生型, HA-Nedd4-LIRm-1, 和 HA-Nedd4-LIRm-4 均有削弱。这暗示着鼠源 Nedd4 的第 2, 3 号 LIR 基序都参与了 M 表达情况下与 LC3 的互作。接着在 M-K60R-FLAG 或 M-APxY-FLAG 表达的 N2a 细胞中检测了 HA-Nedd4 及其 4 个 LIR 基序突变体结合内源性 LC3

的水平, 如图 3-17 B 和 3-17 C 所示, 免疫共沉淀结果显示仅有 HA-Nedd4-LIRm-2 与 LC3 互作的能力得到了削弱, 这说明在无法被泛素化的 M 存在的情况下, 鼠源 Nedd4 的 2 号 LIR 基序承担着和 LC3 互作的功能。以上结果暗示着只有野生型 M 存在时, 才可以使 Nedd4 的第 2, 3 号 LIR 基序发挥功能, 使得 Nedd4 结合 LC3 的能力增强。

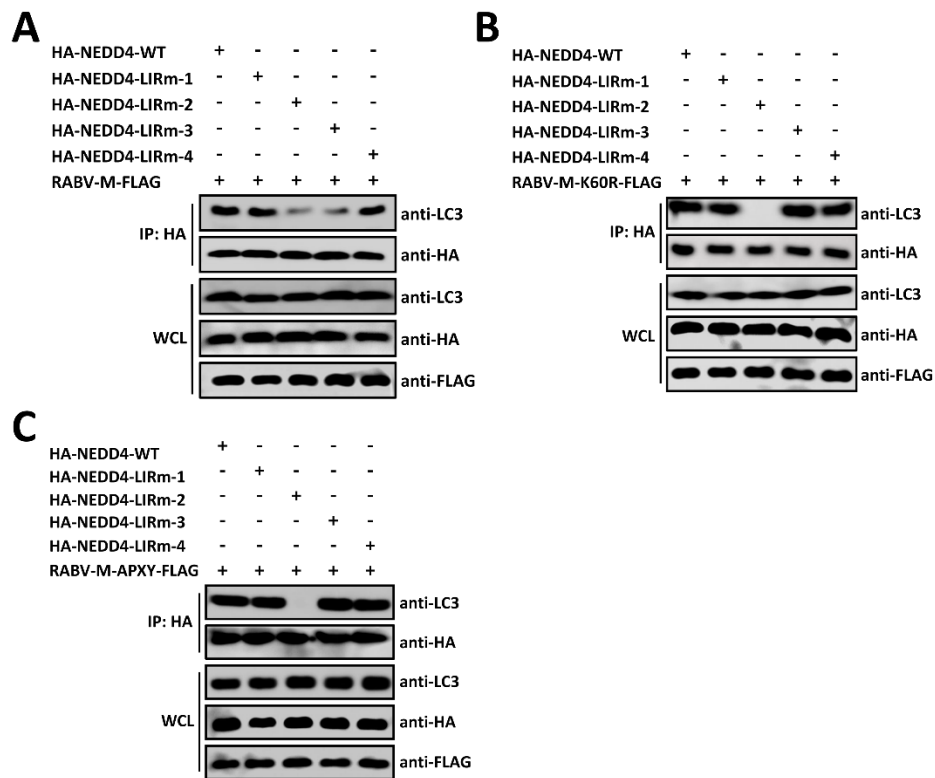


图 3-17 M 及其突变体存在下对各个 Nedd4 的 LIR 基序结合 LC3 的影响

Fig. 3-17 Effect of M and its mutants on LIR motif-binding LC3 of Nedd4

A: M 野生型存在下对各个 Nedd4 的 LIR 基序结合 LC3 的影响

A: Effect of M wild type on LIR motif-binding LC3 of Nedd4

B: M-K60R 突变体存在下对各个 Nedd4 的 LIR 基序结合 LC3 的影响

B: Effect of M-K60R mutant on LIR motif-binding LC3 of Nedd4

C: M-APXY 突变体存在下对各个 Nedd4 的 LIR 基序结合 LC3 的影响

C: Effect of M-APXY mutant on LIR motif-binding LC3 of Nedd4

3.18 LIR 基序突变的 Nedd4 介导 M 引起自噬的能力减弱

接着继续探究了这些 Nedd4 的 LIR 基序突变体对于 M 所引起的细胞自噬的影响, 首先在 N2a 细胞的本体 Nedd4 敲低的前提下分别进行了各个 LIR 基序突变体的 Nedd4 的回补, 再检测 M-FLAG 所引起的细胞自噬的水平变化。如图 3-18 所示, WB 结果显示 HA-Nedd4-LIRm-2 的回补和 HA-Nedd4-LIRm-3 回

补均使得 M 引起 LC3-II 表达量上升的能力明显削弱，且 LC3-II/GAPDH 的比值也显著降低。这些结果说明 Nedd4 的第 2, 3 号 LIR 基序参与了 M 蛋白引起的细胞自噬发生。综合以上结果我们可以推测出 Nedd4 在野生型 M 存在时会暴露出一个新的 LIR 基序来结合 LC3，即 Nedd4 的第 2, 3 号 LIR 基序均参与结合 LC3，最终使得细胞自噬水平上升。

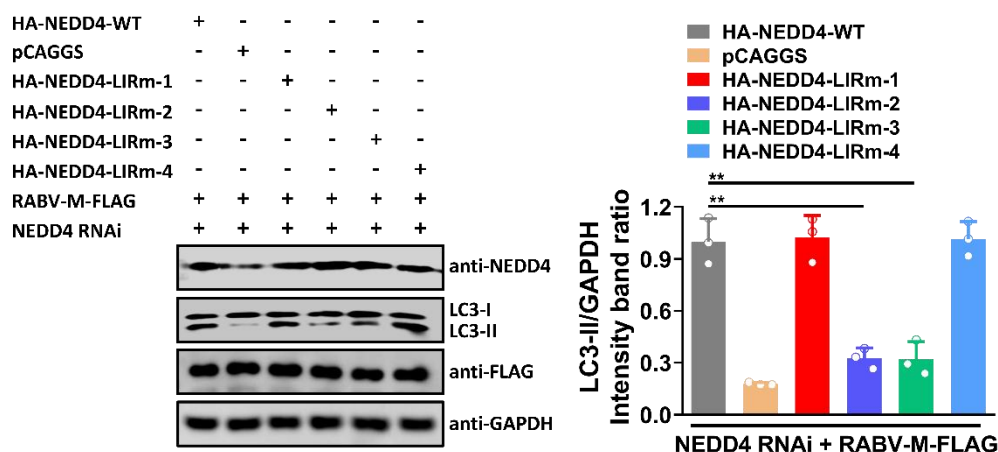


图 3-18 LIR 基序突变的 Nedd4 对 M 蛋白引起的自噬的影响 (n=3)

Fig. 3-18 Effect of LIR motif mutations in Nedd4 on M protein-induced autophagy (n=3)

3.19 M 蛋白及狂犬病病毒感染引起的自噬均为不完全自噬

在阐明 M 蛋白可以通过和 Nedd4 互作来引起细胞自噬发生这一机制后，我们继续探究 M 蛋白所引起的细胞自噬最终走向的是完全自噬还是不完全自噬。首先使用溶酶体追踪试剂 LysoTracker Red 标记活细胞中的溶酶体，并用共聚焦显微镜观察表达 M-FLAG 和 GFP-LC3 的 N2a 细胞，图片结果显示完全自噬刺激剂：Rapamycin 处理的 N2a 细胞中的 GFP-LC3 的点状聚集和 LysoTracker Red 存在明显的共定位，而表达 M-FLAG 组的 N2a 细胞中的 GFP-LC3 的点状聚集则不与 LysoTracker Red 共定位（图 3-19 A）。同时使用共聚焦显微镜观察 RABV 感染后的表达 GFP-LC3 的 N2a 细胞，结果发现 RABV 感染组的 N2a 细胞中的 GFP-LC3 的点状聚集不与 LysoTracker Red 共定位（图 3-19 B）。更进一步的，在 M-FLAG 过表达的 N2a 细胞上使用 Rapamycin 进行刺激，再在共聚焦显微镜下观察 GFP-LC3 的点状聚集和溶酶体的共定位水平的变化。如图 3-19 C 所示，M-FLAG 组的 Rapamycin 刺激下的 GFP-LC3 的点状聚集和溶酶体的共定位水平明显弱于空白对照组。上述结果暗示着 M 的表达和 RABV 感染所引起的细胞自噬是不完全自噬，因为产生的自噬小体不会与溶酶体融合。

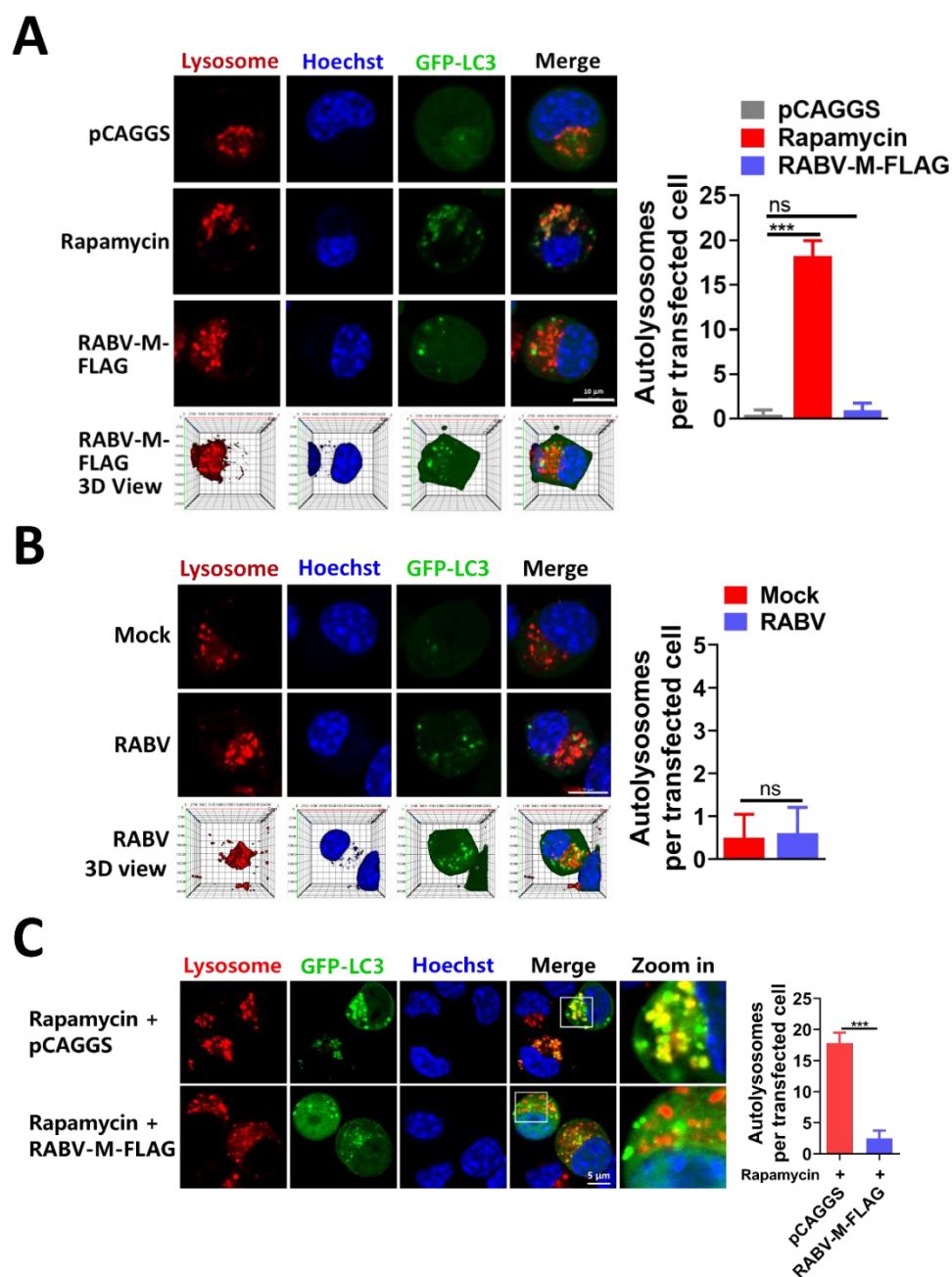


图 3-19 M 蛋白及 RABV 感染引起的 GFP-LC3 点状聚集和溶酶体的共定位关系
 Fig. 3-19 Co-localization of GFP-LC3 punctate aggregation and lysosomes induced by M protein and RABV infection

- A: M 蛋白表达或 Rapamycin 刺激下的 GFP-LC3 点状聚集和溶酶体的共定位 (标尺=10 μm , n=50)
- A: Co-localization of GFP-LC3 punctate aggregation and lysosomes in the presence of M protein or Rapamycin stimulation (Scale bar=10 μm , n=50)
- B: RABV 感染下的 GFP-LC3 点状聚集和溶酶体的共定位 (标尺=10 μm , n=50)
- B: Co-localization of GFP-LC3 punctate aggregation and lysosomes under RABV infection (Scale bar=10 μm , n=50)
- C: Rapamycin 刺激下的 M 蛋白引起的 GFP-LC3 点状聚集和溶酶体的共定位 (标尺=5 μm , n=50)
- C: Co-localization of GFP-LC3 punctate aggregation and lysosomes induced by M protein under the treatment of Rapamycin (Scale bar=5 μm , n=50)

3.20 M 蛋白刺激产生的自噬体不会被溶酶体降解

接下来，分别使用溶酶体酸化抑制剂氯喹（Chloroquine, CQ; 2 μ M 处理 24 h）和溶酶体自噬小体结合抑制剂巴佛洛霉素 A1（Bafilomycin A1, Baf-A1; 10 nM 处理 24 h）来处理过表达 M 的 N2a 细胞，WB 结果如图 3-20 A 和 3-20 B 所示，CQ 处理组或 Baf-A1 处理组的 M 过表达的细胞的 LC3-II 的水平 and 空白处理组的 M 过表达的细胞的 LC3-II 的水平相一致，这暗示着 M 的表达可以阻止自噬小体被溶酶体降解。

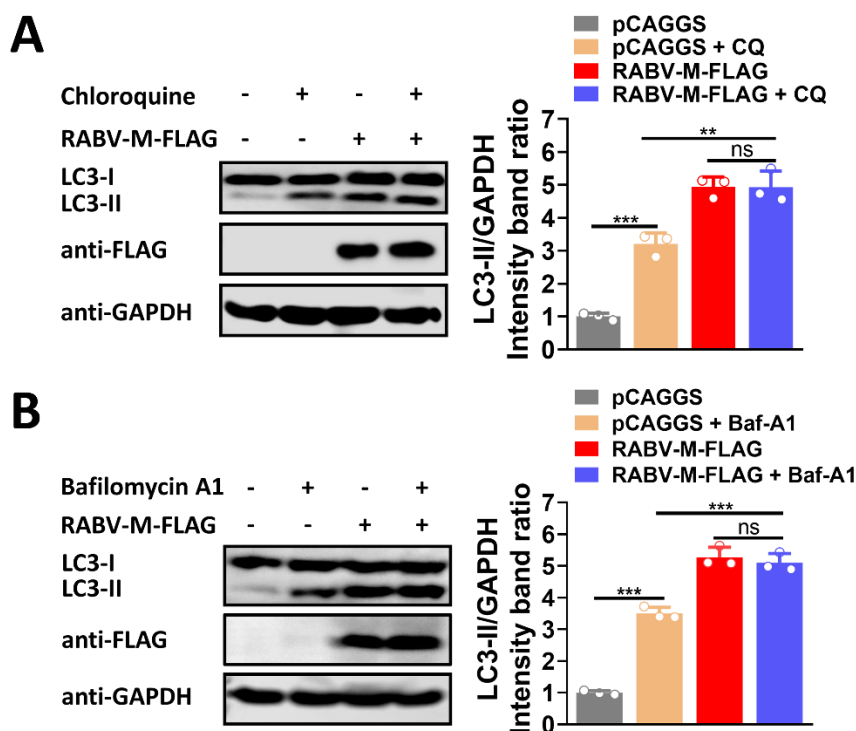


图 3-20 CQ 处理或 Baf-A1 处理下 M 蛋白引起的自噬的变化

Fig. 3-20 Changes in autophagy induced by M protein under CQ or Baf-A1 treatment

A: CQ 处理下 M 蛋白引起的自噬的变化 (n=3)

A: Changes in autophagy induced by M protein under CQ treatment (n=3)

B: Baf-A1 处理下 RABV 感染引起的自噬的变化 (n=3)

B: Changes in autophagy induced by RABV infection under Baf-A1 treatment (n=3)

3.21 M 蛋白引起的细胞自噬流不完整

正常情况下 SQSTM1 (p62) 与 LC3 结合并在自噬溶酶体中被降解。对转染 M-FLAG 质粒不同时间的 N2a 细胞中的 p62 和 LC3 蛋白水平进行了分析，如图 3-21，WB 结果显示随着转染时间的增加，M-FLAG 蛋白的表达量逐渐增加，LC3-II 蛋白的水平也逐渐增加，这说明细胞自噬水平在随着 M-FLAG 的表

达逐渐上升, 但是 p62 蛋白的水平随着转染时间的增加基本没有变化, 这暗示着 M 蛋白引起的细胞自噬流不完整, 说明 M 蛋白可能阻止了自噬小体被降解。

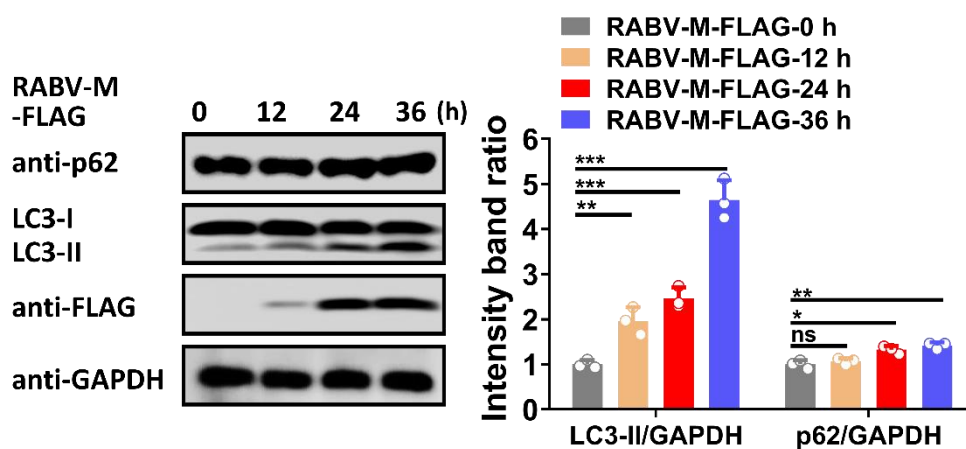


图 3-21 M 蛋白引起的 p62 蛋白水平的变化 (n=3)

Fig. 3-21 Changes in p62 protein levels induced by M protein (n=3)

3.22 M 蛋白阻止自噬小体与溶酶体的融合

为了进一步确认 M 蛋白阻止了自噬小体与溶酶体的融合, 我们使用了一个串联的自噬报告质粒 mCherry-GFP-LC3 来进行实验。该串联自噬报告质粒的 GFP 蛋白在酸性 pH 环境下会被降解, 而 mCherry 蛋白由于对酸性 pH 环境不敏感则不会降解。因此, 当自噬小体与溶酶体融合后, GFP 的绿色荧光强度将会极大的降低, 而 mCherry 的红色荧光强度则不会发生改变, 这会导致两者 merge 出的黄色荧光强度的降低。而当自噬小体不与溶酶体融合时, GFP 的绿色荧光强度不会降低, 其会与 mCherry 的红色荧光 merge 成大量的黄色荧光信号。我们对共转染 mCherry-GFP-LC3 和 M-FLAG 质粒的 N2a 细胞进行了共聚焦显微镜的检测。如图 3-22 所示, 在 M-FLAG 表达的细胞中, 有黄色荧光信号的存在, 表明自噬小体没有与溶酶体融合。而在空白对照组的细胞中, 绿色荧光信号被极大程度的削弱, 黄色荧光信号极少, 但仍可检测到大量红色荧光信号。上述结果表明 M 蛋白确实可以阻止自噬小体与溶酶体的融合。

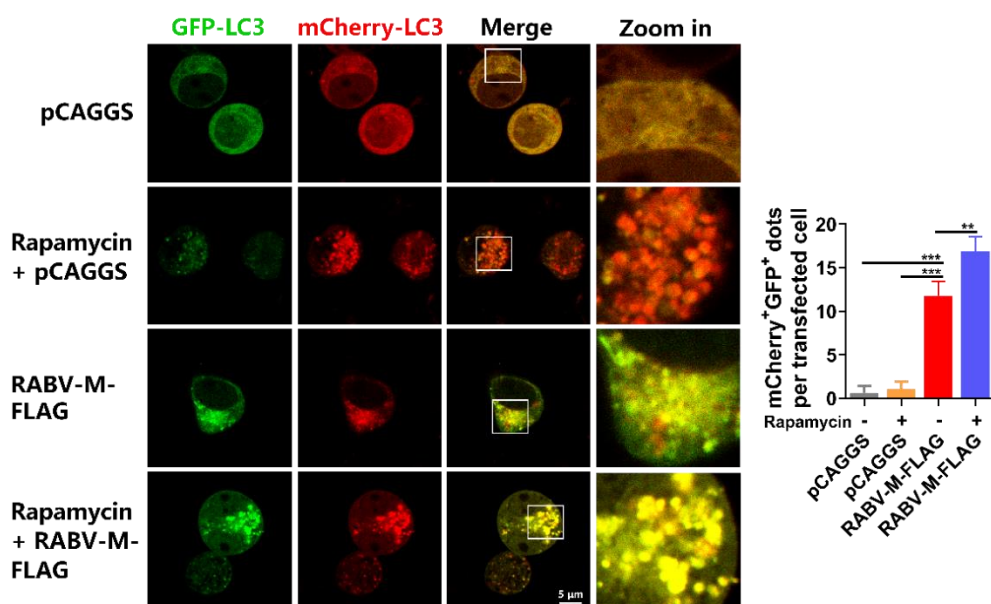


图 3-22 M 蛋白引起的 mCherry-LC3 与 GFP-LC3 的共定位 (标尺=5 μm , n=50)

Fig. 3-22 M protein-induced co-localization of mCherry-LC3 with GFP-LC3 (Scale bar=5 μm , n=50)

3.23 M 蛋白与 Myo1c 存在互作

在确认 M 蛋白可以阻碍自噬小体和溶酶体的融合后, 我们接着探究了 M 蛋白阻碍自噬小体和溶酶体融合的具体机制。首先以 M-FLAG 为诱饵蛋白去钓取 N2a 细胞中与 M-FLAG 互作的蛋白, 然后使用质谱对这些蛋白进行鉴定。我们发现了 N2a 细胞中的 Myo1c 这一蛋白可以与 M 蛋白相互作用 (图 3-23 A)。Myo1c 是一种基于肌动蛋白的慢速单体运动蛋白, 其可将富含磷脂的膜货物与肌动蛋白细胞骨架连接起来。为了确认 Myo1c 与 M 蛋白的相互作用, 在 N2a 细胞中过表达 M-FLAG 并使用免疫共沉淀实验证明了 M-FLAG 可以与内源性的 Myo1c 互作 (图 3-23 B)。

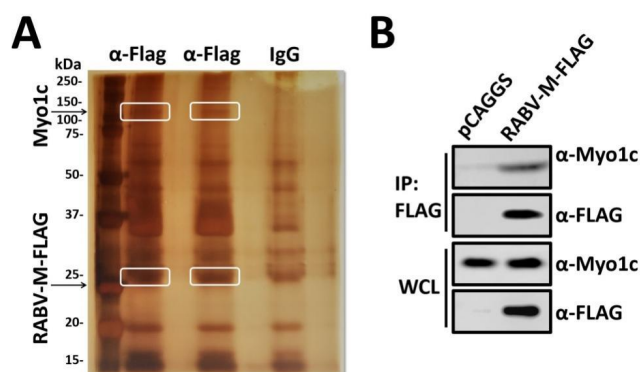


图 3-23 M 蛋白与 Myo1c 的互作

Fig. 3-23 Interaction of M protein with Myo1c

3.24 Myo1c 参与调控自噬

有报道指出 Myo1c 通过调控细胞 F-actin 网络来调节自噬小体和溶酶体的融合(Zhang et al. 2019)。因此首先研究了 Myo1c 对 N2a 细胞中的自噬的影响。我们使用合成的 siRNA 技术对 N2a 细胞中的 Myo1c 进行了敲低, 并使用 qPCR 和 WB 实验确定了针对 Myo1c 的 siRNA 的有效性并选择了第 2 号 RNAi 引物对 (No. 2) 进行后续的实验 (图 3-24 A)。接着使用共聚焦显微镜观察敲低了 Myo1c 的细胞并发现 Myo1c 的敲低可以引起 GFP-LC3 的点状聚集, 且这些点状聚集不与溶酶体共定位 (图 3-24 B), 暗示着 Myo1c 敲低所引起的细胞自噬是不完全自噬。以上结果说明 Myo1c 参与调控了细胞中的自噬。

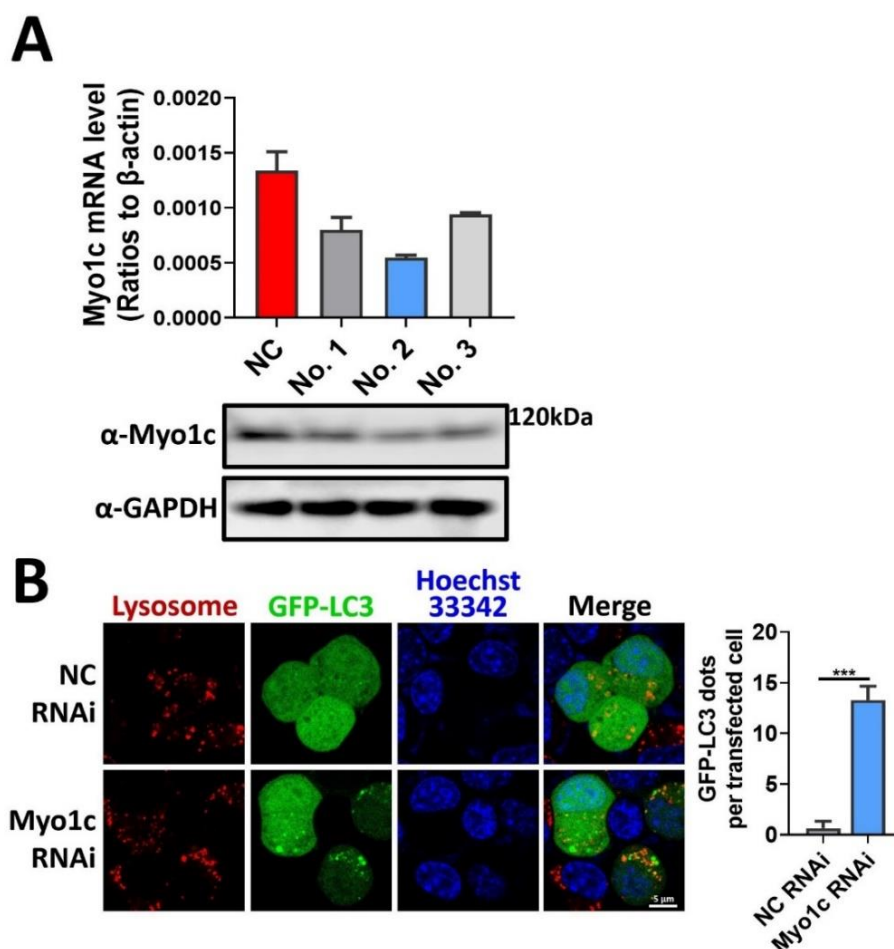


图 3-24 Myo1c 敲低对自噬的影响

Fig. 3-24 Effect of Myo1c knockdown on autophagy

A: 针对 Myo1c 的 siRNAs 的作用效率 (n=3)

A: Efficiency of siRNAs targeting Myo1c (n=3)

B: Myo1c 敲低对 GFP-LC3 点状聚集及其与溶酶体共定位的影响 (标尺=5 μ m, n=50)

B: Effect of Myo1c knockdown on GFP-LC3 punctate aggregation and its co-localization with lysosomes

(Scale bar=5 μ m, n=50)

3.25 Myo1c 的过表达可回复 M 蛋白对细胞自噬的影响

为了确认 Myo1c 对于 M 所引起的自噬的影响。将鼠源的 Myo1c 的 N 端加入 HA-tag 并构建进真核表达载体 pCAGGS 中, 然后将不同摩尔质量的 HA-Myo1c 质粒和 M-FLAG 质粒共转染进 N2a 细胞并检测细胞的自噬水平的变化, 如图 3-25 所示, WB 结果显示随着 HA-Myo1c 蛋白表达量的升高, M-FLAG 所引起的 LC3-II 的表达水平逐渐降低, 这个结果说明在 M 蛋白表达的前提下, Myo1c 的表达可以使得 M 蛋白影响细胞自噬水平的能力降低。

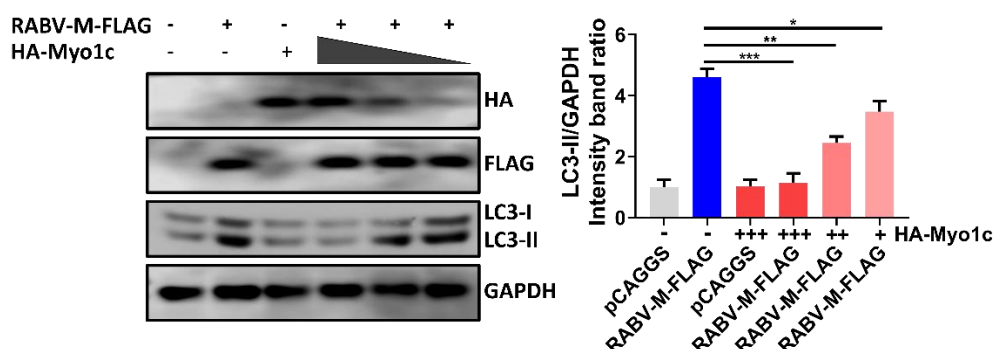
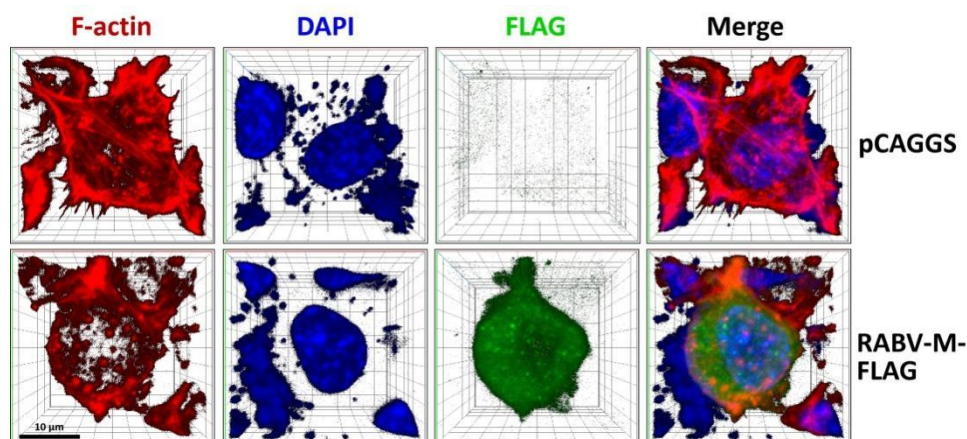


图 3-25 Myo1c 表达对 M 引起的自噬的影响 (n=3)

Fig. 3-25 Effect of Myo1c expression on M-induced autophagy (n=3)

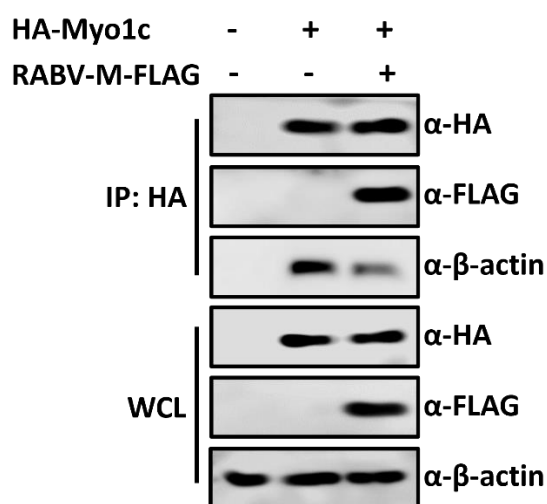
3.26 M 蛋白可以破坏细胞 F-actin 的网络结构

接着我们继续探究了 M 蛋白对于细胞中的 F-actin 网络的影响。使用共聚焦显微镜观察表达了 M 蛋白的 N2a 细胞中的 F-actin, 我们将多层的共聚焦图片进行 3D 重构, 如图 3-26 所示, M 蛋白的表达可以改变 N2a 细胞中 F-actin 的线性分布, 这属于 F-actin 网络被破坏的特征现象(Lee et al. 2010)。上述结果说明 M 蛋白可以破坏细胞中的 F-actin 网络。

图 3-26 M 蛋白表达 F-actin 的影响 (标尺=10 μm)Fig. 3-26 Effect of M protein expression on the F-actin network (Scale bar=10 μm)

3.27 M 蛋白阻碍 Myo1c 与内源性 actin 的结合

在确认 M 蛋白的表达可以破坏细胞内 F-actin 网络后, 我们推测 M 蛋白可能通过和 Myo1c 互作来阻碍细胞 F-actin 网络的搭建。因此接着探究了 M 蛋白是否阻碍了 Myo1c 和 F-actin 的构成单位之一: β -actin 之间的相互作用。在表达 M 蛋白和 Myo1c 蛋白的 N2a 细胞中检测了与 Myo1c 互作的内源性 β -actin 的蛋白水平。如图 3-27 所示, 免疫共沉淀结果显示在 M-FLAG 表达时, 与 HA-Myo1c 互作的内源性 β -actin 相较于对照组发生了明显的减少, 这说明 M-FLAG 阻碍了 Myo1c 结合内源性 β -actin, 综合以上结果, 我们可以推测 M 蛋白可以通过阻碍 Myo1c 结合内源性 β -actin 来破坏 F-actin 网络, 最终使得自噬小体无法与溶酶体融合。

图 3-27 M 蛋白对 Myo1c 与 β -actin 互作的影响Fig. 3-27 Effect of M protein on the interaction between Myo1c and β -actin

3.28 M 蛋白引起的自噬可以增加狂犬病病毒 VLP 的产出

已有报道证明不完全自噬可以促进某些病毒的出芽，由于狂犬病病毒的 M 蛋白专职于病毒出芽，因此接下来继续探究狂犬病病毒的 M 蛋白引起的不完全自噬对于病毒出芽的影响。首先使用 RABV 的病毒类似颗粒（VLP）实验来模拟自然状态下 RABV 出芽的过程。分别在 N2a 细胞中进行了野生型 M 蛋白及其突变体（M-K60R 和 M-APxY）和 G 蛋白的共表达，或者使用自噬发生的抑制剂 3-MA 去处理共表达 M 蛋白和 G 蛋白的 N2a 细胞，然后收集细胞上清并超离得到 RABV 的 VLP，最终通过 WB 检测不同条件下产出 VLP 的水平。如图 3-28 所示，WB 结果显示：各个组的细胞本体所表达的 M 蛋白或其突变体及 G 蛋白的水平均未发生显著改变，说明自噬本身不影响各病毒蛋白的表达水平，但是针对 VLP 组分的结果显示自噬抑制剂 3-MA 的处理可以减少 M 蛋白和 G 蛋白形成 VLP 的水平，自噬刺激功能受到影响的 M 突变体蛋白和 G 蛋白形成 VLP 的水平也发生了明显的削弱。以上结果暗示着自噬的发生可以增加 RABV 的 VLP 产出效率。

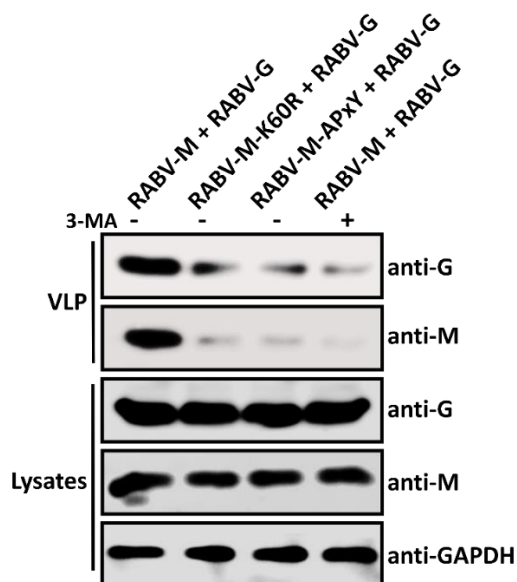


图 3-28 M 突变体及自噬对 RABV VLPs 的影响

Fig. 3-28 Effect of M mutants and autophagy on RABV VLPs production

A: 在 N2a 细胞中，M 突变体及自噬对 RABV VLPs 的影响

A: Effect of M mutants and autophagy on RABV VLPs production in N2a cells

3.29 M 蛋白引起的自噬可以增加狂犬病病毒 VLP 的出芽

接着使用透射电子显微镜观察野生型 M 蛋白和 G 蛋白的共表达的 N2a 细胞，或是抑制剂 3-MA 处理的共表达 M 蛋白和 G 蛋白的 N2a 细胞。如图 3-29 所示，在 M 蛋白和 G 蛋白共表达情况下，细胞膜上有大量的 RABV 的 VLP 出现，说明 RABV 的 VLP 的大量出芽，但是在 M 蛋白与 G 蛋白共表达且使用自噬抑制剂 3-MA 处理的细胞的 N2a 细胞膜上没有大量的 VLP 出现，以上结果进一步暗示了自噬可以增加 RABV 的 VLP 的出芽效率。

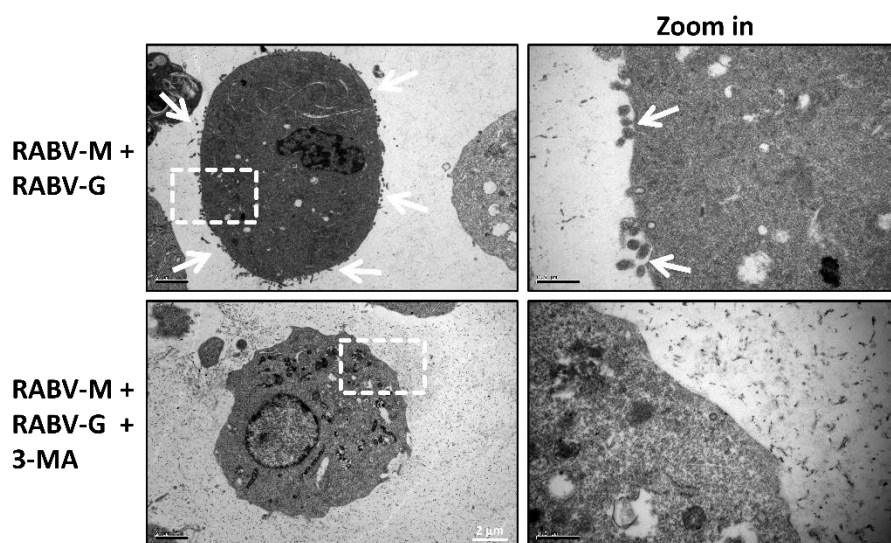


图 3-29 透射电镜观察细胞自噬对 RABV VLPs 的影响 (标尺=2 μm)

Fig. 3-29 Transmission electron microscopic observation of the effect of cellular autophagy on RABV VLPs (Scale bar=2 μm)

3.30 M 蛋白引起的自噬促进狂犬病病毒 VLP 向细胞膜迁移的能力

为了进一步确认 M 蛋白引起的自噬对病毒出芽的影响，使用了共聚焦显微镜去观察表达在 N2a 细胞中的 M 蛋白及其突变体与 G 蛋白的细胞定位情况，以及自噬抑制剂 3-MA 处理下 M 蛋白与 G 蛋白的细胞定位情况。自然状态下，RABV 的 VLP 会迁移至胞膜然后出芽，这意味着正常状态下我们将观察到 M 蛋白和 G 蛋白在细胞膜上的明显的共定位现象。结果正如所推测的，正常状态下的 M-FLAG 和 G-HA 在细胞膜上共定位，但 M-APxY-FLAG 和 M-K60R-FLAG 均不与 G-HA 在细胞膜上共定位，3-MA 处理的细胞中的 M-FLAG 和 G-HA 也未在细胞膜上共定位（图 3-30）。以上结果暗示着 M 蛋白所引起的自噬

的发生可以促进病毒 VLP 向胞膜迁移的能力，进一步确认了 M 蛋白引起的自噬影响了病毒 VLP 的出芽。

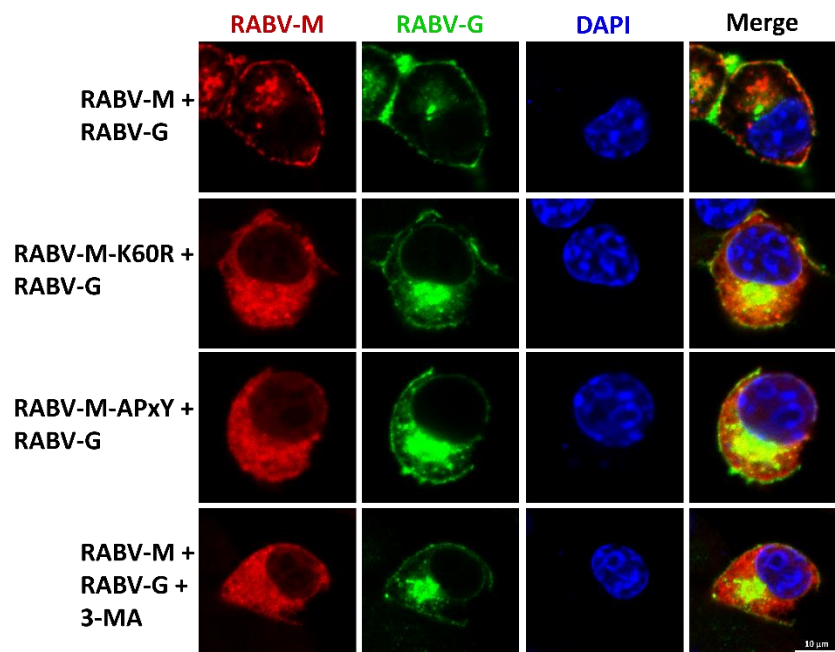


图 3-30 共聚焦显微镜观察 M 突变体及自噬对 M 蛋白和 G 蛋白亚细胞定位的影响 (标尺=10 μm)

Fig. 3-30 Confocal microscopic observation of the effect of M mutants and autophagy on the subcellular localization of M and G proteins (Scale bar=10 μm)

3.31 抑制 M 蛋白引起的自噬可以降低狂犬病病毒 VLP 的产出效率

为了进一步确认自噬直接影响到 RABV 的 VLP 的产生，我们在 Nedd4 或 ATG5（自噬发生的关键基因之一）敲低的条件下检测病毒 VLP 的产出水平的变化。如图 3-31 所示，WB 结果显示 Nedd4 或 ATG5 被敲低时，N2a 细胞中病毒 VLP 的产出水平会发生明显的下降。综合以上结果，我们可以得出结论：抑制自噬会削弱 RABV 的 VLP 的出芽，而诱导自噬发生有利于 RABV 的 VLP 的出芽。

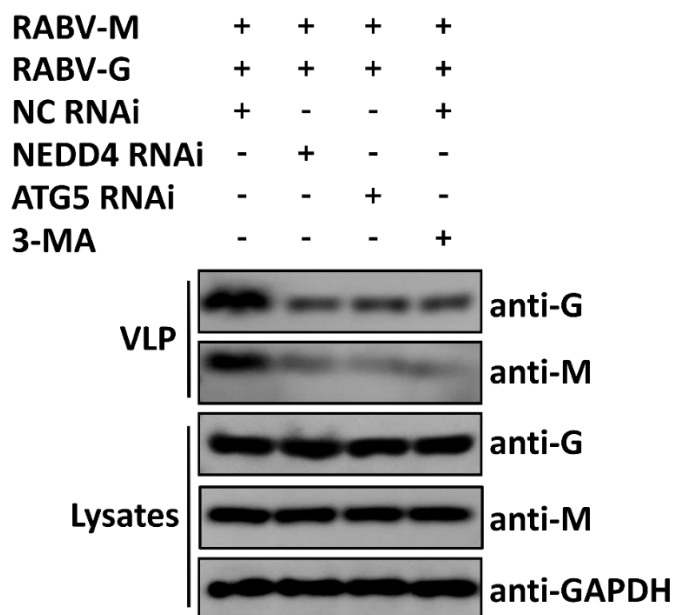


图 3-31 抑制细胞自噬水平对 RABV VLPs 的影响

Fig. 3-31 Effect of inhibiting cellular autophagy on RABV VLPs production

3.32 抑制 M 蛋白引起的自噬可以降低狂犬病病毒的复制速率

接着分别使用了 Nedd4 泛素连接酶的活性抑制剂 Heclin (5 μ M, 24 h) (Mund et al. 2014), 自噬抑制剂 3-MA (1 mM, 24 h), 或是针对 Nedd4 的 siRNA 来处理被 RABV 感染 (MOI=0.01) 的 N2a 细胞, 然后在不同时间点收集细胞上清并检测其中的病毒滴度。如图 3-32 的 A 至 C 图所示, 3-MA, Heclin, 或是 Nedd4 siRNA 的处理均可以使得病毒滴度发生 10 倍左右的降低。这些结果说明, 针对 M 蛋白所引起的自噬进行抑制或对细胞本体自噬进行抑制均不利于病毒的复制, 佐证了我们得到的抑制自噬不利于病毒 VLP 产生, 而刺激自噬发生有利于病毒 VLP 产生这一结果。

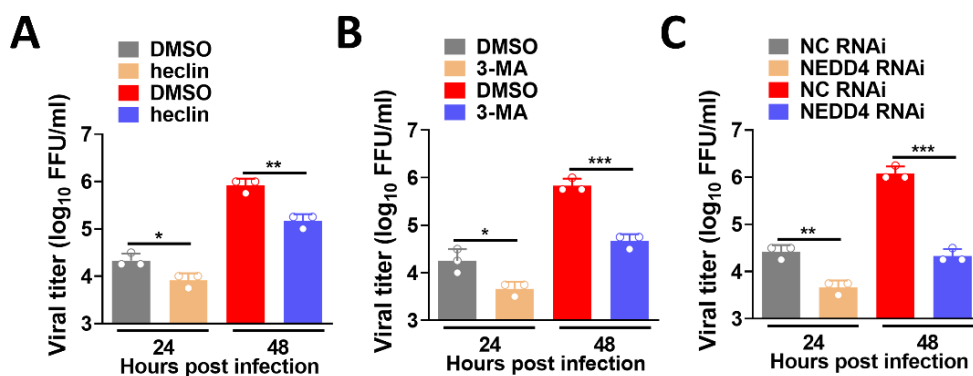


图 3-32 抑制 M 蛋白引起的自噬对 RABV 复制的影响

Fig. 3-32 Effects of inhibition of M protein-induced autophagy on RABV replication

- A: 3-MA 处理对 RABV 复制的影响 (n=3)
A: Effect of 3-MA treatment on RABV Replication (n=3)
B: Heclin 处理对 RABV 复制的影响 (n=3)
B: Effect of Heclin treatment on RABV Replication (n=3)
C: Nedd4 敲低对 RABV 复制的影响 (n=3)
C: Effect of Nedd4 knockdown on RABV Replication (n=3)

3.33 重组狂犬病病毒 rRABV-M-APxY 的扩散速率下降

为了在病毒层面上探究 M 所引起的自噬对于病毒复制的影响。将 M 基因的第 35 位脯氨酸突变为丙氨酸，并替换掉 RABV 原始骨架的 M 基因，最终拯救出了 M 基因的 PPxY 结构域突变成 APxY 的突变 RABV，命名为 rRABV-M-APxY（图 3-33 A）。为了确认突变病毒的成功拯救并同时观察病毒的复制效率，在 N2a 细胞上进行 MOI=0.001 剂量的病毒感染后用低熔点琼脂糖替换掉细胞培养液，这会使得病毒粒子无法通过细胞培养液快速扩散，保证了病毒只能通过细胞膜进行扩散，最终形成的病毒斑可以显示出病毒粒子的扩散速度。在病毒感染 36 小时后，使用 RABV-P 单抗对病毒粒子进行染色后在荧光显微镜下观察，得到的图片结果显示 rRABV-M-APxY 确实被成功拯救，且其形成的病毒荧光斑相较于亲本毒株 rRABV 来说有了明显的缩小（图 3-33 B），这暗示着 rRABV-M-APxY 的复制速率受到了削弱。

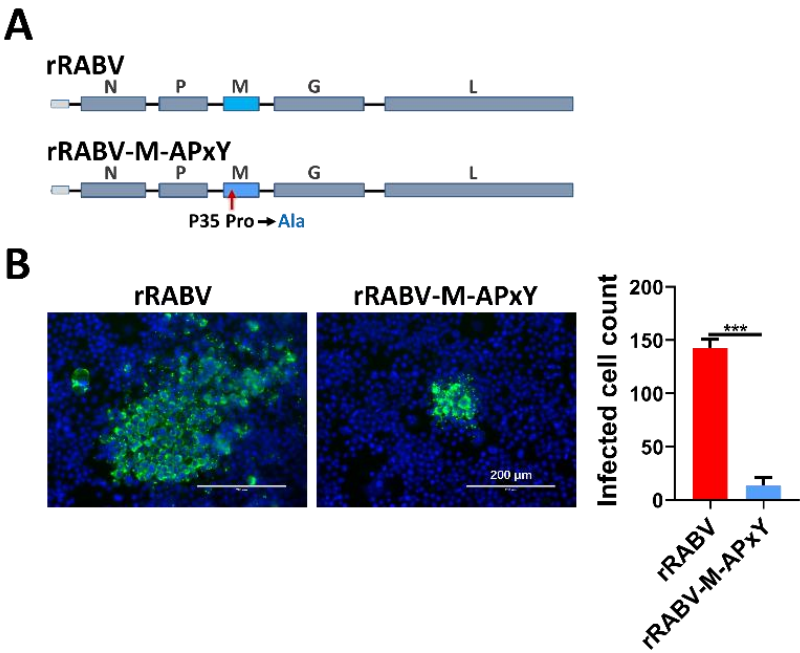


图 3-33 RABV 突变株 rRABV-M-APxY 的扩散速率
Fig. 3-33 Diffusion rate of the RABV mutant strain rRABV-M-APxY

A: 亲本株 rRABV 及突变株 rRABV-M-APxY 的模式图

A: Schematic diagram of parental strain rRABV and mutant strain rRABV-M-APxY

B: 亲本株 rRABV 及突变株 rRABV-M-APxY 在 N2a 细胞上的扩散速率 (标尺=200 μm , n=3)

B: Diffusion rates on N2a cells of parental strain rRABV and mutant strain rRABV-M-APxY (Scale bar=200 μm , n=3)

3.34 重组狂犬病病毒 rRABV-M-APxY 的复制速率下降

为了进一步确定 rRABV-M-APxY 的复制速率的变化, 在 RABV 易感细胞 N2a 和 BSR 上分别进行 MOI=0.01 的剂量的病毒感染, 然后并在不同时间点收取细胞上清以获得 rRABV-M-APxY 和 rRABV 的多步生长曲线。结果如图 3-34 A 和 3-34 B 所示, 不同时间点的细胞上清中的病毒滴度结果显示随着时间增长, rRABV-M-APxY 和 rRABV 的病毒滴度均有先增加再稳定后降低的趋势, 说明两种病毒均可在这两种细胞中进行复制。同时发现每个时间点的 rRABV-M-APxY 的滴度都显著小于亲本毒株 rRABV, 说明 rRABV-M-APxY 的复制速率确实发生了显著的降低。

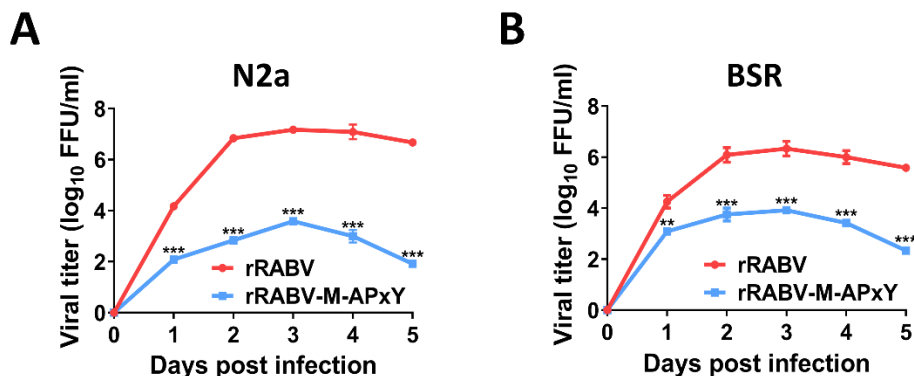


图 3-34 RABV 突变株 rRABV-M-APxY 的复制速率

Fig. 3-34 Replication rate of the RABV mutant strain rRABV-M-APxY

A: 亲本株 rRABV 及突变株 rRABV-M-APxY 在 N2a 细胞上的复制速率 (n=3)

A: Replication rates of parental strain rRABV and mutant strain rRABV-M-APxY on N2a cells (n=3)

B: 亲本株 rRABV 及突变株 rRABV-M-APxY 在 BSR 细胞上的复制速率 (n=3)

B: Replication rates of parental strain rRABV and mutant strain rRABV-M-APxY on BSR cells (n=3)

3.35 重组狂犬病病毒 rRABV-M-APxY 引起自噬的水平下降

由于已经证明了 M-APxY 蛋白无法引起细胞自噬, 因此接下来我们探究了 rRABV-M-APxY 突变毒是否可以引起自噬, 由于 rRABV-M-APxY 的复制效率显著低于亲本毒株 rRABV, 选择用共聚焦显微镜观察 GFP-LC3 的点状聚集现

象，以此来判断 rRABV-M-APxY 感染细胞时引起的自噬水平变化。分别将亲本毒 rRABV 和突变毒 rRABV-M-APxY 以 MOI=1 的剂量去感染表达 GFP-LC3 的 N2a 细胞，在感染后 24 小时开始处理并在共聚焦显微镜下观察活细胞。如图 3-35 所示，rRABV 感染的 N2a 细胞中有明显的 GFP-LC3 点状聚集现象，但是 rRABV-M-APxY 感染的细胞中的 GFP-LC3 点状聚集现象明显弱于 rRABV 感染组，该结果暗示着 rRABV-M-APxY 引起细胞自噬的能力发生了显著的削弱。

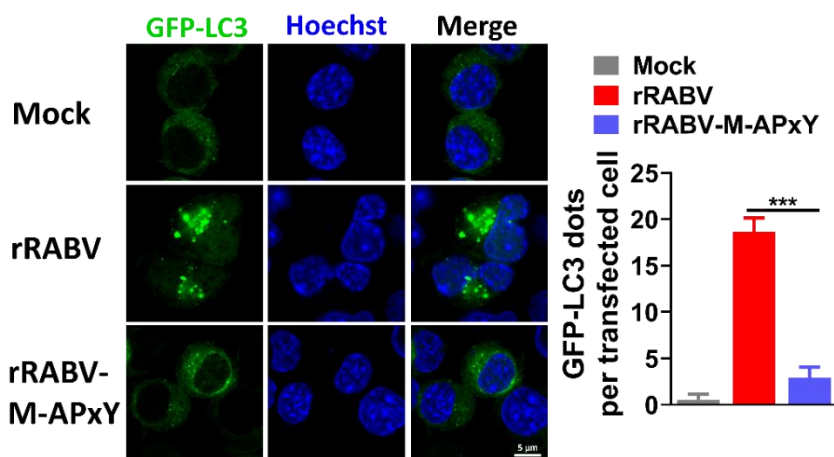


图 3-35 RABV 突变株 rRABV-M-APxY 对 GFP-LC3 的影响 (标尺=5 μ m, n=50)

Fig. 3-32 Effect of the RABV mutant strain rRABV-M-APxY on GFP-LC3 (Scale bar=5 μ m, n=50)

3.36 重组狂犬病病毒 rRABV-M-APxY 的致病性降低

接下来为了确定 rRABV-M-APxY 突变毒的致病性，我们进行了动物攻毒实验。为了保证脑内的初始病毒量一致，对小鼠使用颅内注射的方式分别进行 rRABV 和 rRABV-M-APxY 的攻毒，然后记录攻毒后小鼠的每天的体重变化并绘制生存曲线。小鼠生存曲线的结果如图 3-36 A 所示，脑内注射 rRABV-M-APxY 突变毒的小鼠的生存率达到了 50%，而脑内注射 rRABV 亲本毒的小鼠的生存率则是 0%，该结果说明颅内注射 rRABV-M-APxY 的小鼠致死率会发生显著的降低。相一致的，小鼠每天的体重变化结果显示颅内注射 rRABV-M-APxY 的小鼠的体重变化幅度明显小于颅内注射 rRABV 的小鼠（图 3-36 B）。上述结果说明 rRABV-M-APxY 突变毒的致病性相较于亲本毒 rRABV 发生了明显的降低。

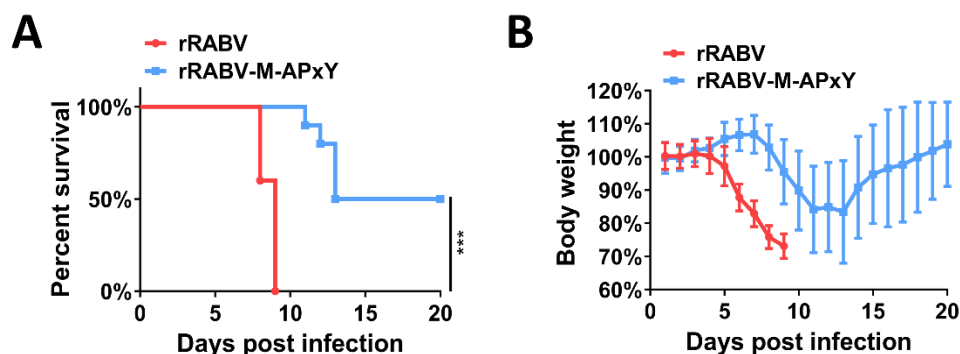


图 3-36 RABV 突变株 rRABV-M-APxY 的致病性

Fig. 3-36 Pathogenicity of the RABV mutant strain rRABV-M-APxY

A: 亲本株 rRABV 及突变株 rRABV-M-APxY 对小鼠的致死率 (n=10)

A: Survival rates in mice infected with parental strain rRABV or mutant strain rRABV-M-APxY (n=10)

B: 感染亲本株 rRABV 或突变株 rRABV-M-APxY 的小鼠的体重变化 (n=10)

B: Body weight changes in mice infected with parental strain rRABV or mutant strain rRABV-M-APxY (n=10)

3.37 重组狂犬病病毒 rRABV-M-APxY 在小鼠脑内的病毒载量下降

病毒的致病性一般与其在宿主内的载量呈正向关系，因此接着对感染 rRABV 和 rRABV-M-APxY 的小鼠的脑组织进行了病毒定量检测。首先使用了 qPCR 来衡量感染 rRABV 和 rRABV-M-APxY 的不同脑区中病毒载量，结果如图 3-37 A 所示，感染 rRABV 的小鼠的嗅球，小脑，大脑皮层和脑干内的病毒 N 蛋白的 mRNA 水平均显著高于感染 rRABV-M-APxY 的小鼠的各个脑区，暗示着这些脑区中的 rRABV 复制速率显著高于 rRABV-M-APxY。然后使用了免疫组化 (IHC) 来对感染 rRABV 和 rRABV-M-APxY 的小鼠的脑组织切片进行 RABV-P 蛋白的染色，结果如图 3-37 B 所示，感染 rRABV 的小鼠的嗅球，小脑，大脑皮层和脑干内的病毒 P 蛋白水平均显著高于感染 rRABV-M-APxY 的小鼠的各个脑区，暗示着这些脑区中的 rRABV 病毒数量显著高于 rRABV-M-APxY 病毒数量。上述结果说明突变毒 rRABV-M-APxY 在小鼠脑内的病毒载量显著低于亲本毒 rRABV。

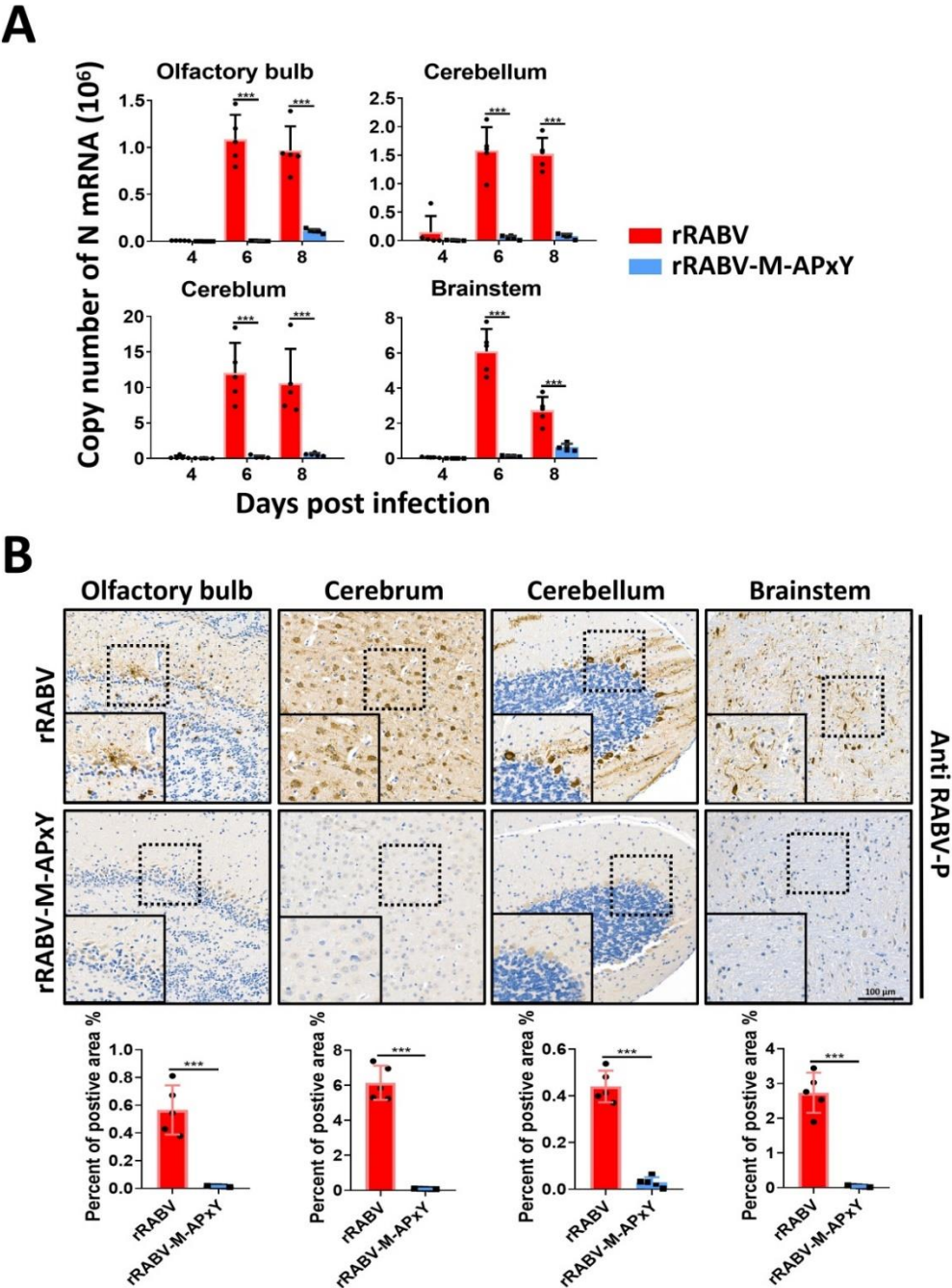


图 3-37 rRABV-M-APxY 在小鼠脑内的病毒载量

Fig. 3-37 Viral load of the RABV mutant strain rRABV-M-APxY in the mouse brain

A: qPCR 检测感染亲本株 rRABV 或突变株 rRABV-M-APxY 在小鼠嗅球、小脑、大脑及脑干中的病毒载量 (n=5)

A: Detection of viral load of parental rRABV and mutant rRABV-M-APxY in mouse olfactory bulb, cerebellum, brain and brainstem by qPCR (n=5)

B: 免疫组化检测感染亲本株 rRABV 或突变株 rRABV-M-APxY 的小鼠的嗅球、小脑、大脑及脑干中的病毒载量 (标尺=100 μ m, n=5)

B: Detection of viral load of parental rRABV and mutant rRABV-M-APxY in mouse olfactory bulb, cerebellum, brain and brainstem by IHC (Scale bar=100 μ m, n=5)

3.38 重组狂犬病病毒 rRABV-M-APxY 在小鼠脑内造成的病理变化较少

接着我们使用了苏木精-伊红（HE）染色法对感染 rRABV 和 rRABV-M-APxY 的小鼠的脑组织切片进行了染色，HE 染色可以用来观察脑组织的病理变化。如图 3-38 所示，在 rRABV 感染的小鼠的大脑皮层中存在血管袖套（vascular cuff）现象，在海马区中存在神经元胶质结节（glia nodule）和神经胶质增生（gliosis）现象，在延脑中存在神经元胶质结节现象，在小脑中存在神经元胶质结节和神经胶质增生现象。这些现象表征着感染 rRABV 的小鼠的脑组织出现了病理变化。而在感染 rRABV-M-APxY 小鼠的脑组织切片中，我们则很少观察到这些现象的存在。HE 染色的结果说明 rRABV-M-APxY 感染对小鼠脑组织的破坏的程度轻于 rRABV 感染，这与之前的脑内病毒载量结果和病毒对小鼠致死率结果是一致的。

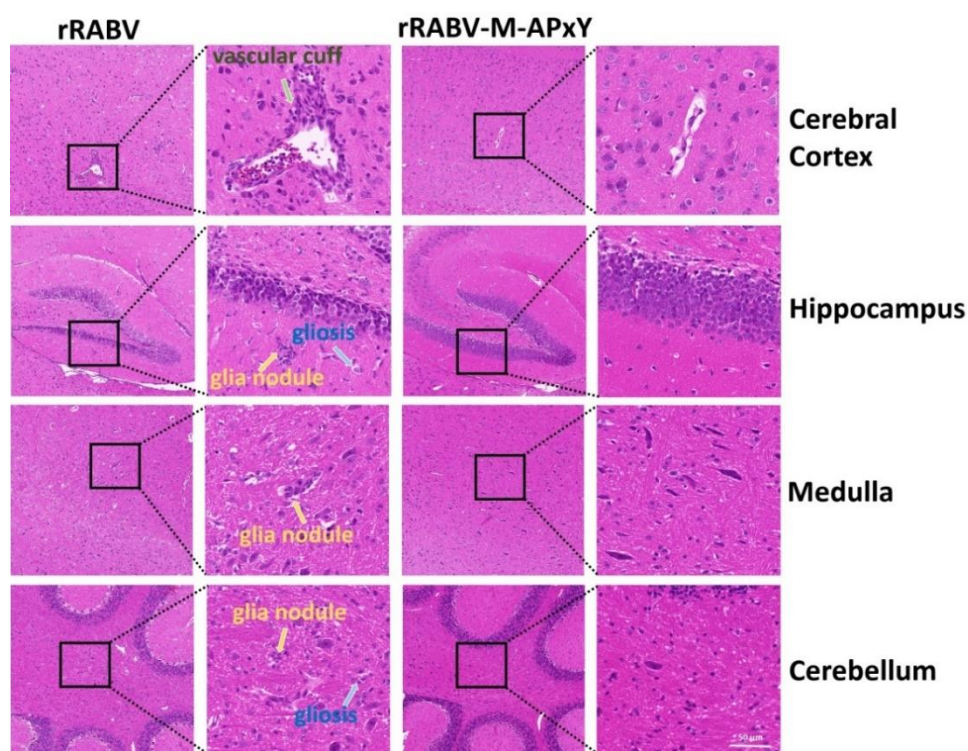


图 3-38 rRABV 及 rRABV-M-APxY 在小鼠脑内造成的病理变化（标尺=50 μm ）

Fig. 3-38 Pathological changes caused by rRABV and rRABV-M-APxY in the mouse brain (Scale bar=50 μm)

3.39 不同丽沙病毒 M 蛋白的 PPxY 结构域和可泛素化位点均保守

M 蛋白的 PPxY 结构域和第 60 位可被泛素化的赖氨酸在丽沙病毒中是极为保守的，通过对 Ikoma lyssavirus (IKOV)，Lleida bat lyssavirus (LLEBV)，Duvnhage virus (DUVV)，Irkut virus (IRKV)，European bat lyssavirus 1 (EBLV-1)，European bat lyssavirus 2 (EBLV-2)，Australian bat lyssavirus (ABLV)，Aravan virus (ARAV)，Bokeloh bat lyssavirus (BBLV)，rabies virus strain SAD-B19 (SAD)，rabies virus strain CVS-11 (CVS)，rabies virus strain SHBRV-18 (SHBRV)，West Caucasian bat virus (WCBV)，Mokola virus (MOKV)，Shimoni bat virus (SHIBV)，以及 Lagos bat virus (LBV) 这些丽沙病毒的氨基酸序列进行了比对并标注了它们的 PPxY 结构域和第 60 位氨基酸。序列比对结果如图 3-39 所示，丽沙病毒属中各病毒的 PPxY 结构域和第 60 位氨基酸确实是保守的，暗示着丽沙病毒的 M 蛋白可能有促进细胞自噬发生的能力。



图 3-39 不同丽沙病毒的 M 蛋白前 60 位氨基酸的序列比对

Fig. 3-39 Sequence comparison of the first 60 amino acids of M proteins of different lyssaviruses

3.40 丽沙病毒的 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白均可引起自噬

由于近年来 ABLV 和 EBLV-1 被报道在澳大利亚和欧洲地区引起了人类的狂犬病。于是我们选择了 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白去探究它们是否和 RABV 的 M 蛋白一样具有促进细胞自噬的能力。首先将 ABLV-M 和 EBLV-1-M 构建进真核表达载体中 (ABLV-M-FLAG 和 EBLV-M-FLAG)，然后分别将这些病毒

蛋白表达质粒转染进 N2a 细胞中。WB 结果显示 EBLV-M-FLAG 和 ABLV-M-FLAG 的表达均可以显著增加细胞内 LC3-II 的水平并使得 LC3-II/GAPDH 的比值上升（图 3-40 A）。进一步分别将这些病毒蛋白表达质粒和 GFP-LC3 表达质粒共转染进 N2a 细胞并使用激光共聚焦显微镜进行观察，得到的图片显示 EBLV-M-FLAG 和 ABLV-M-FLAG 的表达均可以引起明显的 GFP-LC3 的点状聚集现象（图 3-40 B）。这些结果暗示着 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白可以引起细胞自噬的发生。

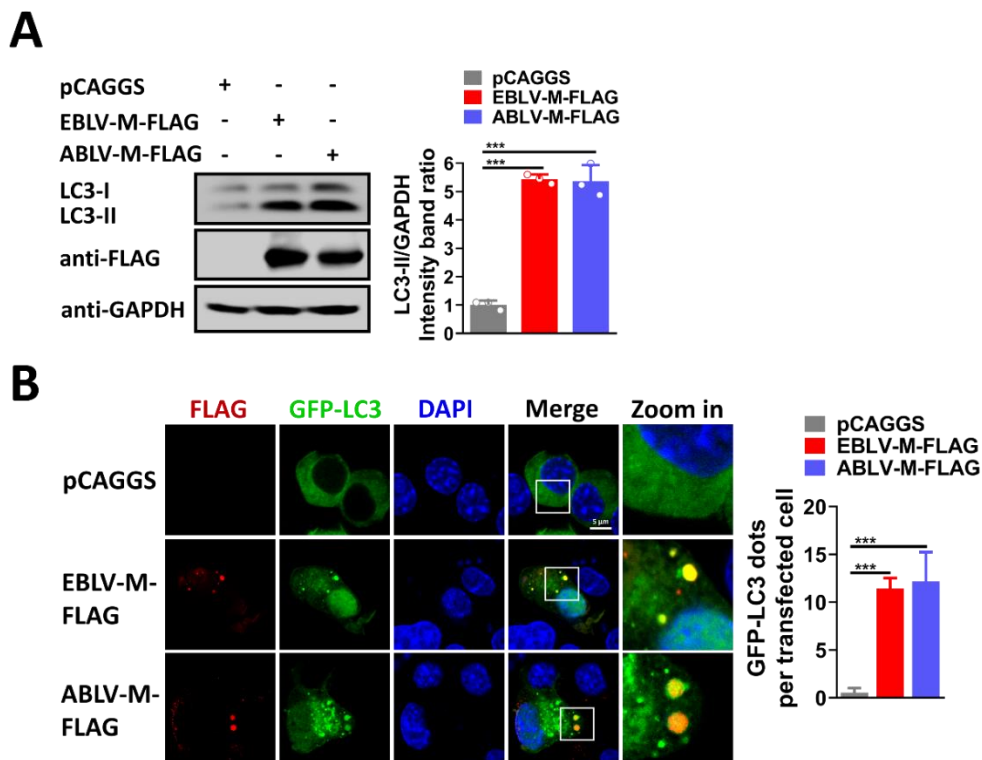


图 3-40 ABLV-M 和 EBLV-M 对细胞自噬的影响

Fig 3-40. Effects of ABLV-M and EBLV-M on autophagy

A: ABLV-M 和 EBLV-M 引起自噬的水平 (n=3)

A: Levels of autophagy induced by ABLV-M and EBLV-M (n=3)

B: ABLV-M 和 EBLV-M 对 GFP-LC3 的影响 (标尺=5 μm, n=50)

B: Effect of ABLV-M and EBLV-M on GFP-LC3 (Scale bar=5 μm, n=50)

3.41 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白均引起不完全自噬

在发现 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白均可以引起自噬发生后，我们继续探究了这些 M 蛋白所引起的细胞自噬是否也与 RABV-M 一样属于不完全自噬。使用溶酶体追踪试剂 LysoTracker Red 标记活细胞中的溶酶体，并用共聚焦显微镜观察共表达 ABLV-M-FLAG 和 GFP-LC3，或是 EBLV-M-FLAG 和 GFP-LC3 的

N2a 细胞，图片结果 3-41 A 显示表达 EBLV-M-FLAG 或是 ABLV-M-FLAG 的 N2a 细胞中的 GFP-LC3 的点状聚集不与 LysoTracker Red 共定位，说明 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白引起的自噬小体不与溶酶体结合。

更进一步的，在 EBLV-M-FLAG 或 ABLV-M-FLAG 过表达的 N2a 细胞上使用 Rapamycin 进行刺激，再在共聚焦显微镜下观察 GFP-LC3 的点状聚集和溶酶体的共定位水平的变化。图片结果 3-41 B 显示 EBLV-M-FLAG 或 ABLV-M-FLAG 表达组的 Rapamycin 刺激下的 GFP-LC3 的点状聚集和溶酶体的共定位水平明显弱于空白对照组。综合以上结果，可以得出 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白所引起的自噬小体不与溶酶体融合，即 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白引起的是不完全自噬。

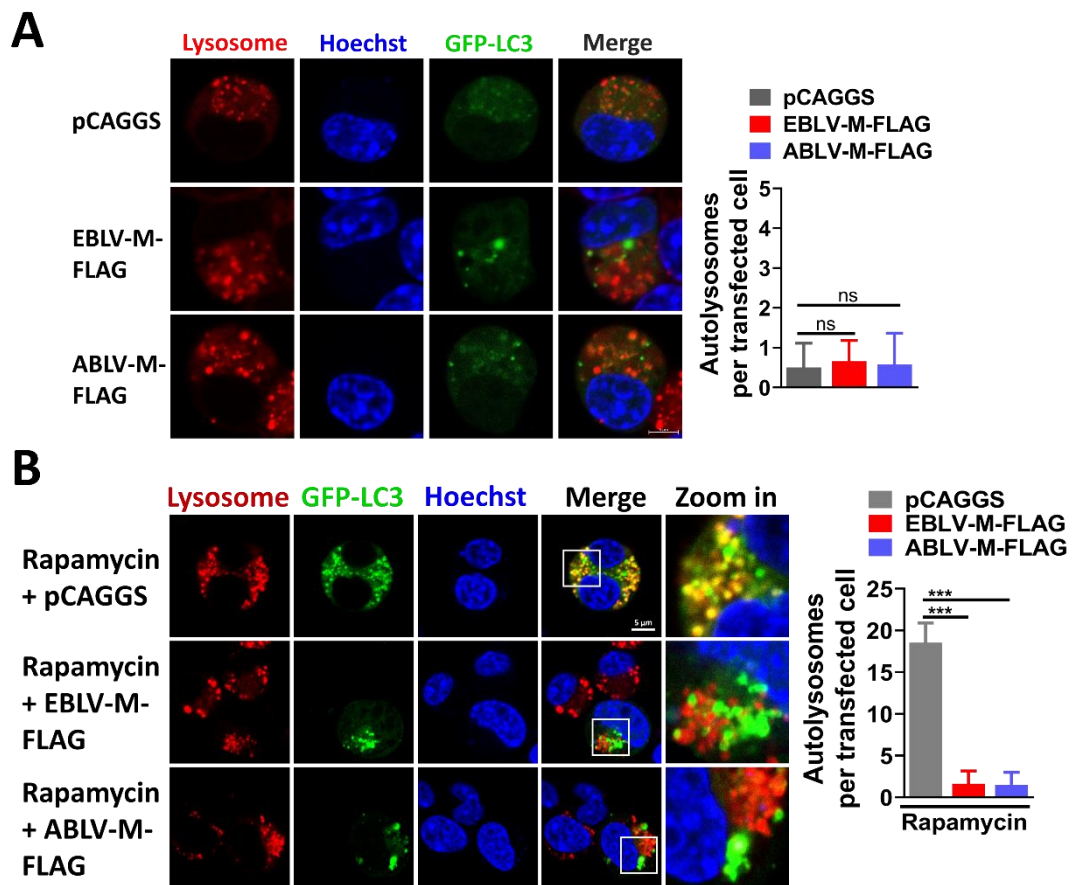


图 3-41 ABLV-M 和 EBLV-M 对 GFP-LC3 点状聚集和溶酶体的共定位的影响

Fig 3-41. Effects of ABLV-M and EBLV-M on GFP-LC3 punctate aggregation and co-localization of lysosomes

A: ABLV-M 和 EBLV-M 引起的 GFP-LC3 点状聚集和溶酶体的共定位 (标尺=5 μ m, n=50)

A: ABLV-M and EBLV-M-induced GFP-LC3 punctate aggregation and co-localization of lysosomes (Scale bar=5 μ m, n=50)

B: 在 Rapamycin 刺激下的 ABLV-M 和 EBLV-M 引起的 GFP-LC3 点状聚集和溶酶体的共定位 (标尺 =5 μm , n=50)

B: Co-localization of GFP-LC3 punctate aggregation and lysosomes induced by ABLV-M and EBLV-M under the treatment of Rapamycin (Scale bar=5 μm , n=50)

3.42 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白与 Nedd4 及 LC3 互作

在确认 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白均可以引起不完全自噬后, 我们想探究 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白是否与 RABV-M 蛋白通过 Nedd4 介导引起自噬发生, 我们首先将 HA-Nedd4 质粒和 ABLV-M-FLAG 或 EBLV-M-FLAG 质粒共转染进 N2a 细胞, 然后检测 ABLV-M-FLAG 或 EBLV-M-FLAG 是否可以与 HA-Nedd4 互作。如图 3-42 A 所示, 免疫共沉淀结果确认了 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白与 HA-Nedd4 的相互作用。接着将 HA-LC3 质粒和 ABLV-M-FLAG 或 EBLV-M-FLAG 质粒共转染进 N2a 细胞, 然后检测 ABLV-M-FLAG 或 EBLV-M-FLAG 是否可以与 HA-LC3 互作。如图 3-42 B 所示, 免疫共沉淀结果确认了 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白均可与 HA-LC3 相互作用。上述结果暗示着 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白可能与 RABV-M 一样, 均通过 Nedd4 来引起自噬的发生。

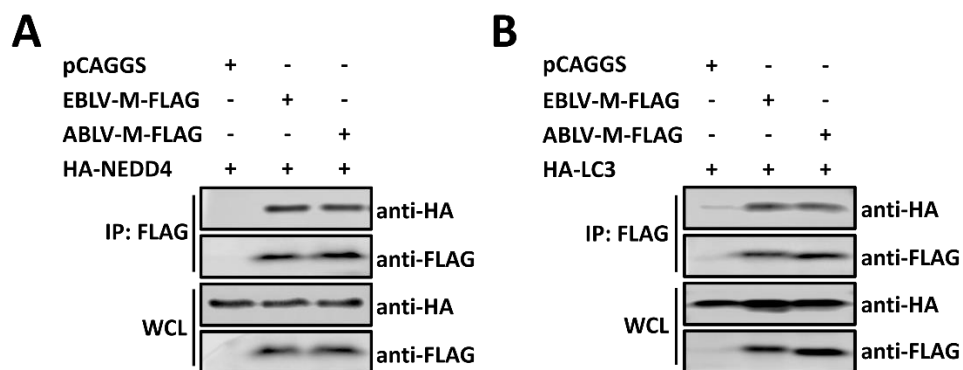


图 3-42 ABLV-M 和 EBLV-M 与 HA-Nedd4 以及 HA-LC3 的互作

Fig 3-42. Interaction of ABLV-M and EBLV-M with HA-Nedd4 and HA-LC3

A: ABLV-M 和 EBLV-M 与 HA-Nedd4 的互作

A: Interaction of ABLV-M and EBLV-M with HA-Nedd4

B: ABLV-M 和 EBLV-M 与 HA-LC3 的互作

B: Interaction of ABLV-M and EBLV-M with HA-LC3

3.43 Nedd4 介导着 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白与 LC3 的互作

为了进一步确认 Nedd4 介导了 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白与 LC3 的互作并引起自噬发生。在 Nedd4 敲低情况下检测了 ABLV-M-FLAG 或 EBLV-M-FLAG 与 HA-LC3 的互作水平。如图 3-43 所示, 免疫共沉淀结果显示在 Nedd4 敲低后

ABLV-M-FLAG 和 EBLV-M-FLAG 均无法再与 HA-LC3 互作。这暗示着 Nedd4 直接参与了 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白和 LC3 的互作，且 Nedd4 可能承担着 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白和 LC3 互作中的桥梁作用。

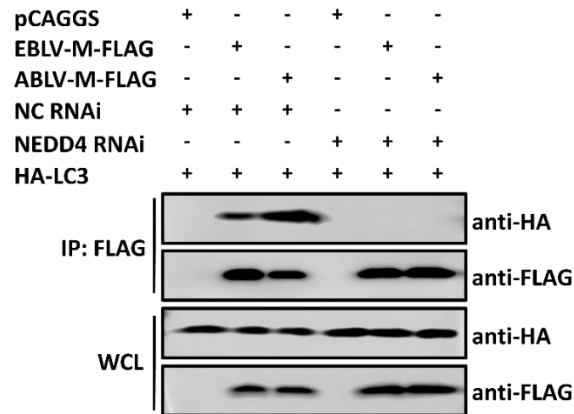


图 3-43 Nedd4 敲低对 ABLV-M 和 EBLV-M 与 HA-LC3 互作的影响

Fig 3-43. Effect of Nedd4 knockdown on ABLV-M and EBLV-M interactions with HA-LC3

3.44 Nedd4 调控 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白引起的自噬

接着我们探究了 Nedd4 对 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白所引起的细胞自噬的影响。在 Nedd4 敲低的情况下，WB 结果显示 ABLV-M-FLAG 和 EBLV-M-FLAG 均不可引起 LC3-II 蛋白水平上升，其 LC3-II/GAPDH 比值也在 Nedd4 被敲低后回复至对照组水平（图 3-44 A 和 3-44 B）。这些与 RABV-M 引起细胞自噬的类似实验的高度一致的结果暗示着 Nedd4 蛋白同样在 ABLV 和 EBLV-1 的 M 蛋白引起的细胞自噬中发挥着关键作用。

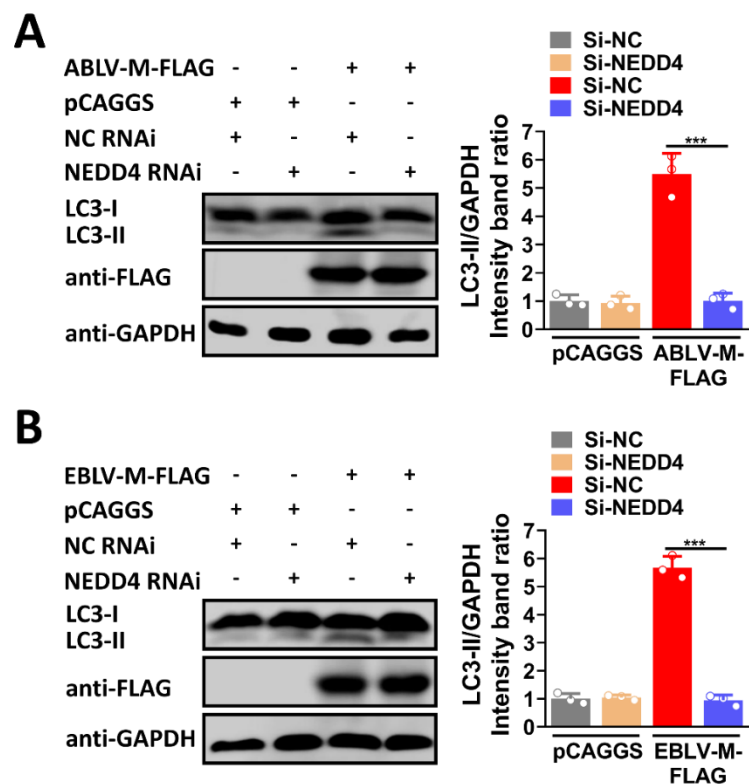


图 3-44 Nedd4 敲低对 ABLV-M 及 EBLV-M 引起的自噬的影响

Fig 3-44. Effect of Nedd4 knockdown on ABLV-M and EBLV-M-induced autophagy

A: Nedd4 敲低对 ABLV-M 引起的自噬的影响 (n=3)

A: Effect of Nedd4 knockdown on ABLV-M-induced autophagy (n=3)

B: Nedd4 敲低对 EBLV-M 引起的自噬的影响 (n=3)

B: Effect of Nedd4 knockdown on EBLV-M-induced autophagy (n=3)

第四章 讨论

4.1 狂犬病病毒的出芽机制

在本研究中发现丽沙病毒属狂犬病病毒的基质蛋白（RABV-M）利用其 PPxY 基序与 E3 泛素蛋白连接酶 Nedd4 相互作用。而 Nedd4 通过其 LC3 结合基序（LIR）招募 LC3。本研究发现 Nedd4 在与可被泛素化的 RABV-M 结合后会多暴露一个 LIR 导致自噬增强。此外，还发现 RABV-M 通过与 Myo1c 相互作用阻碍自噬体和溶酶体的融合，并促进病毒通过自噬体出芽（图 4）。在 M 蛋白的 PPxY 基序或被泛素化位点上进行突变的 RABV-M 显示出自噬小体的形成减少，细胞外病毒样颗粒的产生减少。同样的，在 PPxY 基序上进行点突变的重组 RABV 在体外和体内都表现出不能刺激自噬发生和降低病毒复制效率。更重要的是，我们发现所有丽沙病毒的 M 蛋白可能都有相同的机制，即通过劫持 Nedd4 诱导自噬发生并最终促进病毒出芽。

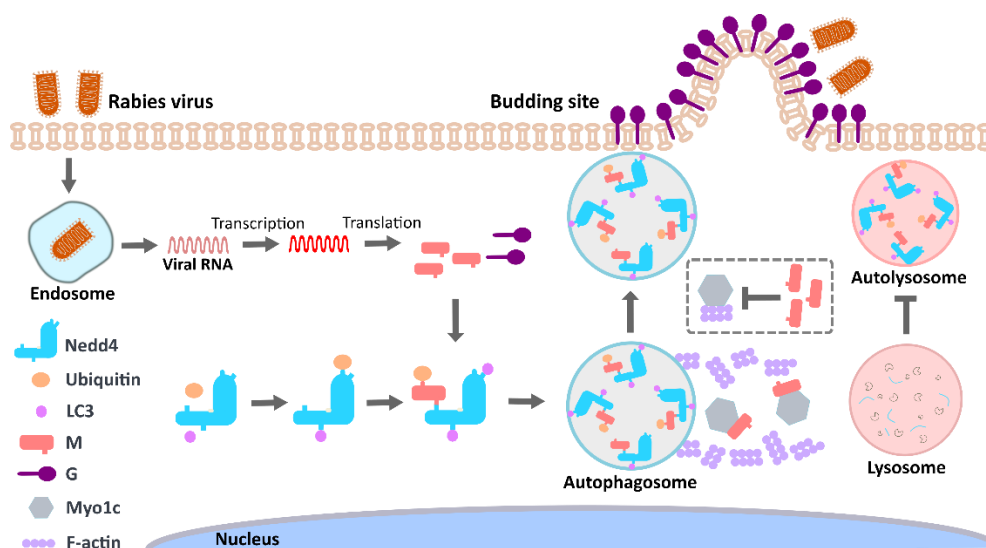


Fig.4 The schematic diagram of RABV-induced incomplete autophagy and viral egress

4.2 狂犬病病毒基质蛋白促进自噬的条件

病毒的出芽与基质蛋白的 PPxY 晚期出芽结构域密切相关，该结构域突变的重组 RABV 及水疱性口炎病毒 VSV 的复制效率会发生明显的下降(Jayakar et al. 2000; Wirblich et al. 2008)。尽管已经发现 PPxY 结构域与病毒的出芽紧密相关，但其机制还未被揭示。另外有研究表明，宿主蛋白 TGS101 和 VPS4A 虽然

可以与弹状病毒的基质蛋白 M 相互作用，但并不影响弹状病毒的出芽过程(Irie et al. 2004)，这意味着存在其他蛋白参与调控弹状病毒的出芽。有报道称 RABV 诱导的自噬促进了病毒的复制，且 RABV 街毒株的 M 蛋白可能负责进行自噬的诱导，但 M 蛋白刺激自噬发生的机制未被解析完全(Peng et al. 2016)。作为 HECT 型 E3 泛素连接酶中的重要一员，Nedd4 已被报道可通过与其 WW 结构域与病毒基质蛋白进行相互作用并参与病毒的出芽过程(Kikonyogo et al. 2001; Segura-Morales et al. 2005; Yasuda et al. 2003)。Nedd4 与病毒基质蛋白的互作促进了病毒基质蛋白的泛素化和病毒基质蛋白被 ESCRT 系统的识别从而使其进入多泡体中 (Kikonyogo et al. 2001)，随后再通过囊泡运输出芽。最近的一项研究解析了 Nedd4 与 LC3 互作的晶体结构(Qiu et al. 2017)，则更加表明了 Nedd4 与自噬之间存在紧密的联系。

有研究表明 Nedd4 可以引起某些具有 PPxY 结构域的病毒蛋白的泛素化 (Vana et al. 2004)。本研究的实验结果同样揭示了 Nedd4 可以引起 RABV-M 的泛素化，且 RABV-M 被泛素化的关键氨基酸位点位于其第 60 位赖氨酸。将第 60 位氨基酸进行突变后得到的 M 突变体：RABV-M-K60R 仍然保留着与 Nedd4 的相互作用，但是 RABV-M-K60R 诱导的自噬水平明显弱于 RABV-M 诱导的自噬水平。这些结果说明除了 RABV-M 和 Nedd4 之间的直接相互作用外，RABV-M 的泛素化也是其诱导自噬水平的关键。这一有趣的现象表明，RABV-M 和 Nedd4 之间的相互作用决定了 M 蛋白是否能够引起自噬，且 RABV-M 的泛素化与否则影响到了 M 蛋白所引起的自噬水平。

为了进一步探究 Nedd4 如何影响 RABV-M 所引发的自噬，本研究检测了 RABV-M 存在时 Nedd4 拉下的 LC3 的水平，发现在 RABV-M 存在时，Nedd4 拉下的内源性 LC3 会出现增加，表明 Nedd4 与泛素化的 RABV-M 相互作用时，Nedd4 可能会暴露出更多的 LIR 用于结合 LC3。为了进一步验证 Nedd4 在 M 存在时是否会发生构象上的变化，首先使用了荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术在 Nedd4 前后分别插入 CFP 和 YFP 荧光蛋白，然后再将其与 M 蛋白及其突变体进行共表达，然后测量 CFP 和 YFP 的荧光共振能量转移效率。如果 Nedd4 在结合 RABV-M 后发生了四级结构的变化，将会导致位于 Nedd4 的 N 端的 CFP 和位于 Nedd4 的 C 端的 YFP 的空间聚集发生改变，这一改变所导致的荧光变化会被记录到。可惜的是，构建出的 N 端偶

联 CFP, C 端偶联 YFP 的 Nedd4 的分子量偏大(超过 160 Kda)且在 N2a 中的表达效率较低, 因此最终得到的结果不足以说明 Nedd4 的结构在 M 蛋白存在下发生了改变。未来我们应该尝试用共结晶的方法取得 Nedd4 与 M 蛋白的晶体并解析其结构, 最终来证明 M 是否导致了 Nedd4 的第三个 LIR 基序的暴露。

4.3 狂犬病病毒基质蛋白阻止完全自噬发生的条件

自噬流的最后一步是自噬体和溶酶体的融合及自噬溶酶体的形成, 许多细胞蛋白如 UVRAG 和 ATG14 参与调控该过程(Diao et al. 2015; Liang et al. 2008), 其中骨架蛋白对自噬体和溶酶体融合的影响也有报道, 如微管蛋白直接参与自噬体和溶酶体的融合(Kimura et al. 2008)。自噬体和溶酶体的融合最终会导致病毒蛋白的降解, 因此某些病毒进化出了干扰自噬溶酶体最终形成的策略。比如 IAV 的 M2 蛋白可以通过与 Beclin-1 的相互作用阻止自噬体和溶酶体之间的融合(Gannagé et al. 2009)。HPIV-3 的磷酸化蛋白 P 通过与 SNAP29 的相互作用抑制自噬体与溶酶体的融合从而引起自噬体的积累(Ding et al. 2014)。通过分析以 RABV-M-FLAG 所拉下的蛋白的质谱数据, 我们发现了 Myo1c 蛋白可与 RABV-M 相互作用。之前的研究证明了丧失功能的 Myo1c 会导致自噬泡和溶酶体的融合失败(Brandstaetter et al. 2014)。我们的实验结果证明了 RABV-M 通过阻断 Myo1c 和 β -actin 之间的相互作用破坏细胞 F-actin 网络, 并最终阻止自噬体和溶酶体的融合。细胞骨架的破坏会影响多种细胞生理过程, RABV 对神经元骨架的破坏已有报道, 但 RABV 破坏神经元细胞骨架的具体机制尚未完全阐明(Sundaramoorthy et al. 2020)。RABV-M 所引起的神经元细胞骨架破坏的后果是多样的, 其是否与 RABV 感染所导致的神经退行性变化相关还需要进一步的探究。

4.4 狂犬病病毒基质蛋白通过自噬调控病毒出芽

为了证实 RABV-M 诱导的不完全自噬对细胞外病毒产量的影响。我们应用狂犬病病毒 VLP 实验(Kang et al. 2015; Liu et al. 2021)来评估自噬对 RABV 出芽的影响。结果证明: 使用自噬抑制剂处理或者表达 RABV-M 的自噬相关的突变体均可以减少细胞培养上清液中的 VLP 产量。共聚焦显微镜拍摄的照片进一步表明, 自噬抑制剂和 RABV-M 的自噬相关的突变体的表达将导致 M 蛋白无法

迁移到细胞膜上。诱发自噬则会增加 RABV VLP 的产出。以上结果说明，特异性靶向狂犬病病毒的 PPxY 基序的小分子药物将对狂犬病病毒的出芽产生极显著的抑制效果。科学家们已经研发出了专职与 PPxY 基序互作的小分子化合物 (Han et al. 2021)，我们的研究侧面暗示了这些化合物在抑制狂犬病病毒感染上可能会有较好的效果。由于不存在针对狂犬病病毒的特效药物，且 PPxY 基序在人类蛋白中未被发现。因此针对 PPxY 基序的小分子化合物研发将有可能诞生出首个针对狂犬病病毒感染的特效药物，这在 RABV 频发的发展中国家中具有极高的经济和社会价值。

第五章 结论

- (1) 狂犬病病毒感染和其基质蛋白的表达可以引起细胞自噬，且均由 Nedd4 介导，Nedd4 在基质蛋白引起的自噬中充当自噬受体的角色用以桥接基质蛋白和 LC3；
- (2) 基质蛋白通过和 Myo1c 互作来引起细胞骨架 F-actin 紊乱，进而阻碍溶酶体和自噬小体的融合，使得病毒基质蛋白引起的自噬体累积且不被溶酶体降解；
- (3) 抑制细胞自噬会显著降低狂犬病病毒 VLP 的膜迁移和出芽效率，替换为无法引起自噬的基质蛋白的重组狂犬病病毒的出芽速率明显降低，其对小鼠的致病性也显著降低；
- (4) 丽沙病毒属的澳洲蝙蝠株和欧洲蝙蝠株丽沙病毒的基质蛋白也通过 Nedd4 来引起自噬发生。

参考文献

1. Adamek N, Coluccio LM, Geeves MA. Calcium sensitivity of the cross-bridge cycle of Myo1c, the adaptation motor in the inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105: 5710-5715.
2. Albertini AA, Ruigrok RW, Blondel D. Rabies virus transcription and replication. *Advances in virus research*, 2011, 79: 1-22.
3. Alemu EA, Lamark T, Torgersen KM, Birgisdottir AB, Larsen KB, Jain A, Olsvik H, Øvervatn A, Kirkin V, Johansen T. ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. *The Journal of biological chemistry*, 2012, 287: 39275-39290.
4. Antonioli M, Di Rienzo M, Piacentini M, Fimia GM. Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy. *Trends in biochemical sciences*, 2017, 42: 28-41.
5. Arif E, Wagner MC, Johnstone DB, Wong HN, George B, Pruthi PA, Lazzara MJ, Nihalani D. Motor protein Myo1c is a podocyte protein that facilitates the transport of slit diaphragm protein Nephl to the podocyte membrane. *Molecular and cellular biology*, 2011, 31: 2134-2150.
6. Bakowski MA, Desjardins CA, Smelkinson MG, Dunbar TL, Lopez-Moyado IF, Rifkin SA, Cuomo CA, Troemel ER. Ubiquitin-mediated response to microsporidia and virus infection in *C. elegans*. *PLoS pathogens*, 2014, 10: e1004200.
7. Banyard AC, Fooks ARJMA. The impact of novel lyssavirus discovery. 2017, 38: 17-21.
8. Bas L, Papinski D, Licheva M, Torggler R, Rohringer S, Schuschnig M, Kraft C. Reconstitution reveals Ykt6 as the autophagosomal SNARE in autophagosome-vacuole fusion. *The Journal of cell biology*, 2018, 217: 3656-3669.
9. Baskaran S, Carlson LA, Stjepanovic G, Young LN, Kim DJ, Grob P, Stanley RE, Nogales E, Hurley JH. Architecture and dynamics of the autophagic phosphatidylinositol 3-kinase complex. *eLife*, 2014, 3.
10. Batters C, Arthur CP, Lin A, Porter J, Geeves MA, Milligan RA, Molloy JE, Coluccio LM. Myo1c is designed for the adaptation response in the inner ear. *The EMBO journal*, 2004, 23: 1433-1440.
11. Bauer A, Nolden T, Nemitz S, Perlson E, Finke S. A Dynein Light Chain 1 Binding Motif in Rabies Virus Polymerase L Protein Plays a Role in Microtubule Reorganization and Viral Primary Transcription. *Journal of virology*, 2015, 89: 9591-9600.
12. Ben Khalifa Y, Luco S, Besson B, Sonthonnax F, Archambaud M, Grimes JM, Larrous F, Bourhy H. The matrix protein of rabies virus binds to RelAp43 to

- modulate NF- κ B-dependent gene expression related to innate immunity. *Scientific reports*, 2016, 6: 39420.
13. Besson B, Sonthonnax F, Duchateau M, Ben Khalifa Y, Larrous F, Eun H, Hourdel V, Matondo M, Chamot-Rooke J, Grailhe R, Bourhy H. Regulation of NF- κ B by the p105-ABIN2-TPL2 complex and RelAp43 during rabies virus infection. *PLoS pathogens*, 2017, 13: e1006697.
14. Birgisdottir Å B, Lamark T, Johansen T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *Journal of cell science*, 2013, 126: 3237-3247.
15. Blanchard T. Rabies and other lyssavirus diseases. *Lancet (London, England)*, 2004, 363: 1906-1907; author reply 1907.
16. Bose A, Guilherme A, Robida SI, Nicoloro SM, Zhou QL, Jiang ZY, Pomerleau DP, Czech MP. Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. *Nature*, 2002, 420: 821-824.
17. Bose A, Robida S, Furcinitti PS, Chawla A, Fogarty K, Corvera S, Czech MP. Unconventional myosin Myo1c promotes membrane fusion in a regulated exocytic pathway. *Molecular and cellular biology*, 2004, 24: 5447-5458.
18. Bozic M, van den Bekerom L, Milne BA, Goodman N, Roberston L, Prescott AR, Macartney TJ, Dawe N, McEwan DG. A conserved ATG2-GABARAP family interaction is critical for phagophore formation. *EMBO reports*, 2020, 21: e48412.
19. Brandstaetter H, Kendrick-Jones J, Buss F. Myo1c regulates lipid raft recycling to control cell spreading, migration and Salmonella invasion. *Journal of cell science*, 2012, 125: 1991-2003.
20. Brandstaetter H, Kishi-Itakura C, Tumbarello DA, Manstein DJ, Buss F. Loss of functional MYO1C/myosin 1c, a motor protein involved in lipid raft trafficking, disrupts autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 2014, 10: 2310-2323.
21. Brzózka K, Finke S, Conzelmann KK. Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *Journal of virology*, 2005, 79: 7673-7681.
22. Cadwell K. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis. *Nature reviews. Immunology*, 2016, 16: 661-675.
23. Cai Y, Su J, Wang N, Zhao W, Zhu M, Su S. Comprehensive analysis of the ubiquitome in rabies virus-infected brain tissue of *Mus musculus*. *Veterinary microbiology*, 2020, 241: 108552.
24. Cao XR, Lill NL, Boase N, Shi PP, Croucher DR, Shan H, Qu J, Sweezer EM, Place T, Kirby PA, Daly RJ, Kumar S, Yang B. Nedd4 controls animal growth by regulating IGF-1 signaling. *Science signaling*, 2008, 1: ra5.
25. Charlton KM, Casey GA, Campbell JB. Experimental rabies in skunks: mechanisms of infection of the salivary glands. *Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee*, 1983, 47: 363-369.

26. Charlton KM, Nadin-Davis S, Casey GA, Wandeler AI. The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. *Acta neuropathologica*, 1997, 94: 73-77.
27. Chen XW, Leto D, Chiang SH, Wang Q, Saltiel AR. Activation of RalA is required for insulin-stimulated Glut4 trafficking to the plasma membrane via the exocyst and the motor protein Myo1c. *Developmental cell*, 2007, 13: 391-404.
28. Chenik M, Chebli K, Gaudin Y, Blondel D. In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N): existence of two N-binding sites on P protein. *The Journal of general virology*, 1994, 75 (Pt 11): 2889-2896.
29. Chiramel AI, Dougherty JD, Nair V, Robertson SJ, Best SM. FAM134B, the Selective Autophagy Receptor for Endoplasmic Reticulum Turnover, Inhibits Replication of Ebola Virus Strains Makona and Mayinga. *The Journal of infectious diseases*, 2016, 214: S319-s325.
30. Chowdhury S, Otomo C, Leitner A, Ohashi K, Aebersold R, Lander GC, Otomo T. Insights into autophagosome biogenesis from structural and biochemical analyses of the ATG2A-WIPI4 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115: E9792-e9801.
31. Clarke AJ, Simon AK. Autophagy in the renewal, differentiation and homeostasis of immune cells. *Nature reviews. Immunology*, 2019, 19: 170-183.
32. Coudevylle N, Banaś B, Baumann V, Schuschnig M, Zawadzka-Kazimierczuk A, Koźmiński W, Martens S. Mechanism of Atg9 recruitment by Atg11 in the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *The Journal of biological chemistry*, 2022, 298: 101573.
33. Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunological reviews*, 2011, 240: 92-104.
34. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology*, 2013, 13: 722-737.
35. Diao J, Liu R, Rong Y, Zhao M, Zhang J, Lai Y, Zhou Q, Wilz LM, Li J, Vivona S, Pfuetzner RA, Brunger AT, Zhong Q. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature*, 2015, 520: 563-566.
36. Ding B, Zhang G, Yang X, Zhang S, Chen L, Yan Q, Xu M, Banerjee AK, Chen M. Phosphoprotein of human parainfluenza virus type 3 blocks autophagosome-lysosome fusion to increase virus production. *Cell host & microbe*, 2014, 15: 564-577.
37. Ding B, Zhang L, Li Z, Zhong Y, Tang Q, Qin Y, Chen M. The Matrix Protein of Human Parainfluenza Virus Type 3 Induces Mitophagy that Suppresses Interferon Responses. *Cell host & microbe*, 2017, 21: 538-547.e534.
38. Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Molecular cell*, 2014, 55: 238-252.

39. Dunn R, Klos DA, Adler AS, Hicke L. The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. *The Journal of cell biology*, 2004, 165: 135-144.
40. Evans AS, Lennemann NJ, Coyne CB. BPIFB3 Regulates Endoplasmic Reticulum Morphology To Facilitate Flavivirus Replication. *Journal of virology*, 2020, 94.
41. Fass E, Shvets E, Degani I, Hirschberg K, Elazar Z. Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *The Journal of biological chemistry*, 2006, 281: 36303-36316.
42. Fisher CR, Streicker DG, Schnell MJ. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers. *Nature reviews. Microbiology*, 2018, 16: 241-255.
43. Fletcher K, Ulferts R, Jacquin E, Veith T, Gammoh N, Arasteh JM, Mayer U, Carding SR, Wileman T, Beale R, Florey O. The WD40 domain of ATG16L1 is required for its non-canonical role in lipidation of LC3 at single membranes. *The EMBO journal*, 2018, 37.
44. Fooks AR, Banyard AC, Horton DL, Johnson N, McElhinney LM, Jackson AC. Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet (London, England)*, 2014, 384: 1389-1399.
45. Fouladkou F, Landry T, Kawabe H, Neeb A, Lu C, Brose N, Stambolic V, Rotin D. The ubiquitin ligase Nedd4-1 is dispensable for the regulation of PTEN stability and localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105: 8585-8590.
46. Fracchiolla D, Sawa-Makarska J, Martens S. Beyond Atg8 binding: The role of AIM/LIR motifs in autophagy. *Autophagy*, 2017, 13: 978-979.
47. Fujioka Y, Suzuki SW, Yamamoto H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Akada R, Inagaki F, Ohsumi Y, Noda NN. Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nature structural & molecular biology*, 2014, 21: 513-521.
48. Fujioka Y, Alam JM, Noshiro D, Mouri K, Ando T, Okada Y, May AI, Knorr RL, Suzuki K, Ohsumi Y, Noda NN. Phase separation organizes the site of autophagosome formation. *Nature*, 2020, 578: 301-305.
49. Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, Yoshimori T. An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Molecular biology of the cell*, 2008, 19: 4651-4659.
50. Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Rämer PC, Lee M, Strowig T, Arrey F, Conenello G, Pypaert M, Andersen J, García-Sastre A, Münz C. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell host & microbe*, 2009, 6: 367-380.
51. Gao J, Reggiori F, Ungermann C. A novel in vitro assay reveals SNARE topology and the role of Ykt6 in autophagosome fusion with vacuoles. *The Journal of cell biology*, 2018, 217: 3670-3682.

52. Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature cell biology*, 2018, 20: 233-242.
53. Ghanbarpour A, Valverde DP, Melia TJ, Reinisch KM. A model for a partnership of lipid transfer proteins and scramblases in membrane expansion and organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118.
54. Gillespie PG, Cyr JL. Myosin-1c, the hair cell's adaptation motor. *Annual review of physiology*, 2004, 66: 521-545.
55. Gluska S, Zahavi EE, Chein M, Gradus T, Bauer A, Finke S, Perlson E. Rabies Virus Hijacks and accelerates the p75NTR retrograde axonal transport machinery. *PLoS pathogens*, 2014, 10: e1004348.
56. Han Z, Ye H, Liang J, Shepley-McTaggart A, Wrobel JE, Reitz AB, Whigham A, Kavelish KN, Saporito MS, Freedman BD, Shtanko O, Harty RN. Compound FC-10696 Inhibits Egress of Marburg Virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2021, 65: e0008621.
57. Harty RN, Paragas J, Sudol M, Palese P. A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. *Journal of virology*, 1999, 73: 2921-2929.
58. Harty RN, Brown ME, McGettigan JP, Wang G, Jayakar HR, Huibregtse JM, Whitt MA, Schnell MJ. Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: a budding interaction. *Journal of virology*, 2001, 75: 10623-10629.
59. Harvey KF, Dinudom A, Cook DI, Kumar S. The Nedd4-like protein KIAA0439 is a potential regulator of the epithelial sodium channel. *The Journal of biological chemistry*, 2001, 276: 8597-8601.
60. Huang D, Xu B, Liu L, Wu L, Zhu Y, Ghanbarpour A, Wang Y, Chen FJ, Lyu J, Hu Y, Kang Y, Zhou W, Wang X, Ding W, Li X, Jiang Z, Chen J, Zhang X, Zhou H, Li JZ, et al. TMEM41B acts as an ER scramblase required for lipoprotein biogenesis and lipid homeostasis. *Cell metabolism*, 2021, 33: 1655-1670.e1658.
61. Hui X, Zhang L, Cao L, Huang K, Zhao Y, Zhang Y, Chen X, Lin X, Chen M, Jin M. SARS-CoV-2 promote autophagy to suppress type I interferon response. *Signal transduction and targeted therapy*, 2021, 6: 180.
62. Hurley JH, Young LN. Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annual review of biochemistry*, 2017, 86: 225-244.
63. Irie T, Licata JM, McGettigan JP, Schnell MJ, Harty RN. Budding of PPxY-containing rhabdoviruses is not dependent on host proteins TGS101 and VPS4A. *Journal of virology*, 2004, 78: 2657-2665.
64. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 2012, 151: 1256-1269.
65. Jacob Y, Real E, Tordo N. Functional interaction map of lyssavirus phosphoprotein: identification of the minimal transcription domains. *Journal of virology*, 2001, 75: 9613-9622.

66. Jayakar HR, Murti KG, Whitt MA. Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus matrix protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release. *Journal of virology*, 2000, 74: 9818-9827.
67. Kamynina E, Debonneville C, Bens M, Vandewalle A, Staub O. A novel mouse Nedd4 protein suppresses the activity of the epithelial Na⁺ channel. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2001, 15: 204-214.
68. Kanelis V, Rotin D, Forman-Kay JD. Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nature structural biology*, 2001, 8: 407-412.
69. Kang H, Qi Y, Wang H, Zheng X, Gao Y, Li N, Yang S, Xia X. Chimeric rabies virus-like particles containing membrane-anchored GM-CSF enhances the immune response against rabies virus. *Viruses*, 2015, 7: 1134-1152.
70. Keller MD, Torres VJ, Cadwell K. Autophagy and microbial pathogenesis. *Cell death and differentiation*, 2020, 27: 872-886.
71. Kelly RM, Strick PL. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *Journal of neuroscience methods*, 2000, 103: 63-71.
72. Kikonyogo A, Bouamr F, Vana ML, Xiang Y, Aiyar A, Carter C, Leis J. Proteins related to the Nedd4 family of ubiquitin protein ligases interact with the L domain of Rous sarcoma virus and are required for gag budding from cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98: 11199-11204.
73. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell structure and function*, 2008, 33: 109-122.
74. Köchl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2006, 7: 129-145.
75. Kojima I, Onomoto K, Zuo W, Ozawa M, Okuya K, Naitou K, Izumi F, Okajima M, Fujiwara T, Ito N, Yoneyama M, Yamada K, Nishizono A, Sugiyama M, Fujita T, Masatani T. The Amino Acid at Position 95 in the Matrix Protein of Rabies Virus Is Involved in Antiviral Stress Granule Formation in Infected Cells. *Journal of virology*, 2022, 96: e0081022.
76. Komarova AV, Real E, Borman AM, Brocard M, England P, Tordo N, Hershey JW, Kean KM, Jacob Y. Rabies virus matrix protein interplay with eIF3, new insights into rabies virus pathogenesis. *Nucleic acids research*, 2007, 35: 1522-1532.
77. König P, Svrlanska A, Read C, Feichtinger S, Stamminger T. The Autophagy-Initiating Protein Kinase ULK1 Phosphorylates Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp28 and Regulates Efficient Virus Release. *Journal of virology*, 2021, 95.
78. Kuo SM, Chen CJ, Chang SC, Liu TJ, Chen YH, Huang SY, Shih SR. Inhibition of Avian Influenza A Virus Replication in Human Cells by Host Restriction Factor TUFM Is Correlated with Autophagy. *mBio*, 2017, 8.
79. Lafon M. Rabies virus receptors. *Journal of neurovirology*, 2005, 11: 82-87.

80. Lamark T, Johansen T. Mechanisms of Selective Autophagy. *Annual review of cell and developmental biology*, 2021, 37: 143-169.
81. Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS, Pandey UB, Kaushik S, Tresse E, Lu J, Taylor JP, Cuervo AM, Yao TP. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *The EMBO journal*, 2010, 29: 969-980.
82. Lennemann NJ, Coyne CB. Dengue and Zika viruses subvert reticulophagy by NS2B3-mediated cleavage of FAM134B. *Autophagy*, 2017, 13: 322-332.
83. Lentz TL, Burrage TG, Smith AL, Tignor GH. The acetylcholine receptor as a cellular receptor for rabies virus. *The Yale journal of biology and medicine*, 1983, 56: 315-322.
84. Li YE, Wang Y, Du X, Zhang T, Mak HY, Hancock SE, McEwen H, Pandzic E, Whan RM, Aw YC, Lukmantara IE, Yuan Y, Dong X, Don A, Turner N, Qi S, Yang H. TMEM41B and VMP1 are scramblases and regulate the distribution of cholesterol and phosphatidylserine. *The Journal of cell biology*, 2021, 220.
85. Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, Vergne I, Deretic V, Feng P, Akazawa C, Jung JU. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature cell biology*, 2008, 10: 776-787.
86. Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of virology*, 1998, 72: 8586-8596.
87. Liu J, Wang H, Gu J, Deng T, Yuan Z, Hu B, Xu Y, Yan Y, Zan J, Liao M, DiCaprio E, Li J, Su S, Zhou J. BECN1-dependent CASP2 incomplete autophagy induction by binding to rabies virus phosphoprotein. *Autophagy*, 2017, 13: 739-753.
88. Liu X, Li F, Zhang J, Wang L, Wang J, Wen Z, Wang Z, Shuai L, Wang X, Ge J, Zhao D, Bu Z. The ATPase ATP6V1A facilitates rabies virus replication by promoting virion uncoating and interacting with the viral matrix protein. *The Journal of biological chemistry*, 2021, 296: 100096.
89. Lu C, Pribanic S, Debonneville A, Jiang C, Rotin D. The PY motif of ENaC, mutated in Liddle syndrome, regulates channel internalization, sorting and mobilization from subapical pool. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2007, 8: 1246-1264.
90. Luo J, Zhang Y, Zhang Q, Wu Y, Zhang B, Mo M, Tian Q, Zhao J, Mei M, Guo X. The Deoptimization of Rabies Virus Matrix Protein Impacts Viral Transcription and Replication. *Viruses*, 2019, 12.
91. Lupfer C, Thomas PG, Anand PK, Vogel P, Milasta S, Martinez J, Huang G, Green M, Kundu M, Chi H, Xavier RJ, Green DR, Lamkanfi M, Dinarello CA, Doherty PC, Kanneganti TD. Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nature immunology*, 2013, 14: 480-488.

92. Lycke E, Tsiang H. Rabies virus infection of cultured rat sensory neurons. *Journal of virology*, 1987, 61: 2733-2741.
93. Maeda S, Otomo C, Otomo T. The autophagic membrane tether ATG2A transfers lipids between membranes. *eLife*, 2019, 8.
94. Maeda S, Yamamoto H, Kinch LN, Garza CM, Takahashi S, Otomo C, Grishin NV, Forli S, Mizushima N, Otomo T. Structure, lipid scrambling activity and role in autophagosome formation of ATG9A. *Nature structural & molecular biology*, 2020, 27: 1194-1201.
95. Malakhova OA, Zhang DE. ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response. *The Journal of biological chemistry*, 2008, 283: 8783-8787.
96. Mao J, Lin E, He L, Yu J, Tan P, Zhou Y. Autophagy and Viral Infection. *Advances in experimental medicine and biology*, 2019, 1209: 55-78.
97. Matoba K, Kotani T, Tsutsumi A, Tsuji T, Mori T, Noshiro D, Sugita Y, Nomura N, Iwata S, Ohsumi Y, Fujimoto T, Nakatogawa H, Kikkawa M, Noda NN. Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion. *Nature structural & molecular biology*, 2020, 27: 1185-1193.
98. Matsui T, Jiang P, Nakano S, Sakamaki Y, Yamamoto H, Mizushima N. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *The Journal of cell biology*, 2018, 217: 2633-2645.
99. Mavrakakis M, Méhouas S, Réal E, Iseni F, Blondel D, Tordo N, Ruigrok RW. Rabies virus chaperone: identification of the phosphoprotein peptide that keeps nucleoprotein soluble and free from non-specific RNA. *Virology*, 2006, 349: 422-429.
100. McEwan DG, Popovic D, Gubas A, Terawaki S, Suzuki H, Stadel D, Coxon FP, Miranda de Stegmann D, Bhogaraju S, Maddi K, Kirchof A, Gatti E, Helfrich MH, Wakatsuki S, Behrends C, Pierre P, Dikic I. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Molecular cell*, 2015, 57: 39-54.
101. Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, Füllgrabe J, Jackson A, Jimenez Sanchez M, Karabiyik C, Licitra F, Lopez Ramirez A, Pavel M, Puri C, Renna M, Ricketts T, Schlotawa L, Vicinanza M, Won H, Zhu Y, *et al.* Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron*, 2017, 93: 1015-1034.
102. Mesdaghi S, Murphy DL, Sánchez Rodríguez F, Burgos-Mármol JJ, Rigden DJ. In silico prediction of structure and function for a large family of transmembrane proteins that includes human Tmem41b. *F1000Research*, 2020, 9: 1395.
103. Miyakawa K, Nishi M, Ogawa M, Matsunaga S, Sugiyama M, Nishitsuji H, Kimura H, Ohnishi M, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Ryo A. Galectin-9 restricts hepatitis B virus replication via p62/SQSTM1-mediated selective autophagy of viral core proteins. *Nature communications*, 2022, 13: 531.

104. Morita E, Sundquist WI. Retrovirus budding. *Annual review of cell and developmental biology*, 2004, 20: 395-425.
105. Morrione A, Plant P, Valentinis B, Staub O, Kumar S, Rotin D, Baserga R. mGrb10 interacts with Nedd4. *The Journal of biological chemistry*, 1999, 274: 24094-24099.
106. Moy RH, Gold B, Molleston JM, Schad V, Yanger K, Salzano MV, Yagi Y, Fitzgerald KA, Stanger BZ, Soldan SS, Cherry S. Antiviral autophagy restricts Rift Valley fever virus infection and is conserved from flies to mammals. *Immunity*, 2014, 40: 51-65.
107. Mund T, Lewis MJ, Maslen S, Pelham HR. Peptide and small molecule inhibitors of HECT-type ubiquitin ligases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111: 16736-16741.
108. Muscolino E, Schmitz R, Loroch S, Caragliano E, Schneider C, Rizzato M, Kim YH, Krause E, Juranić Lisnić V, Sickmann A, Reimer R, Ostermann E, Brune W. Herpesviruses induce aggregation and selective autophagy of host signalling proteins NEMO and RIPK1 as an immune-evasion mechanism. *Nature microbiology*, 2020, 5: 331-342.
109. Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2020, 21: 439-458.
110. Nevers Q, Scrima N, Glon D, Le Bars R, Decombe A, Garnier N, Ouldali M, Lagaudrière-Gesbert C, Blondel D, Albertini A, Gaudin Y. Properties of rabies virus phosphoprotein and nucleoprotein biocondensates formed in vitro and in cellulo. *PLoS pathogens*, 2022, 18: e1011022.
111. Ng WM, Fedosyuk S, English S, Augusto G, Berg A, Thorley L, Haselon AS, Segireddy RR, Bowden TA, Douglas AD. Structure of trimeric pre-fusion rabies virus glycoprotein in complex with two protective antibodies. *Cell host & microbe*, 2022, 30: 1219-1230.e1217.
112. Nguyen TN, Padman BS, Usher J, Oorschot V, Ramm G, Lazarou M. Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *The Journal of cell biology*, 2016, 215: 857-874.
113. Nikolic J, Le Bars R, Lama Z, Scrima N, Lagaudrière-Gesbert C, Gaudin Y, Blondel D. Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles. *Nature communications*, 2017, 8: 58.
114. Ogino T, Green TJ. RNA Synthesis and Capping by Non-segmented Negative Strand RNA Viral Polymerases: Lessons From a Prototypic Virus. *Frontiers in microbiology*, 2019, 10: 1490.
115. Okawa F, Hama Y, Zhang S, Morishita H, Yamamoto H, Levine TP, Mizushima N. Evolution and insights into the structure and function of the DedA superfamily containing TMEM41B and VMP1. *Journal of cell science*, 2021, 134.
116. Okumura A, Pitha PM, Harty RN. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105: 3974-3979.
117. Okumura A, Harty RN. Rabies virus assembly and budding. *Advances in virus research*, 2011, 79: 23-32.
118. Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, Burns D, Leib DA, Levine B. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell host & microbe*, 2007, 1: 23-35.
119. Orvedahl A, Levine B. Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell death and differentiation*, 2009, 16: 57-69.
120. Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter R, Jr., Tallóczy Z, Zou Z, Levine B. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell host & microbe*, 2010, 7: 115-127.
121. Osawa T, Kotani T, Kawaoka T, Hirata E, Suzuki K, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Noda NN. Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nature structural & molecular biology*, 2019, 26: 281-288.
122. Pak Y, Glowacka WK, Bruce MC, Pham N, Rotin D. Transport of LAPTM5 to lysosomes requires association with the ubiquitin ligase Nedd4, but not LAPTM5 ubiquitination. *The Journal of cell biology*, 2006, 175: 631-645.
123. Paludan SR, Pradeu T, Masters SL, Mogensen TH. Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nature reviews. Immunology*, 2021, 21: 137-150.
124. Peng J, Zhu S, Hu L, Ye P, Wang Y, Tian Q, Mei M, Chen H, Guo X. Wild-type rabies virus induces autophagy in human and mouse neuroblastoma cell lines. *Autophagy*, 2016, 12: 1704-1720.
125. Plant PJ, Lafont F, Lecat S, Verkade P, Simons K, Rotin D. Apical membrane targeting of Nedd4 is mediated by an association of its C2 domain with annexin XIIIb. *The Journal of cell biology*, 2000, 149: 1473-1484.
126. Potratz M, Zaack LM, Weigel C, Klein A, Freuling CM, Müller T, Finke S. Neuroglia infection by rabies virus after anterograde virus spread in peripheral neurons. *Acta neuropathologica communications*, 2020, 8: 199.
127. Préhaud C, Lay S, Dietzschold B, Lafon M. Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis. *Journal of virology*, 2003, 77: 10537-10547.
128. Qiu Y, Zheng Y, Wu KP, Schulman BA. Insights into links between autophagy and the ubiquitin system from the structure of LC3B bound to the LIR motif from the E3 ligase NEDD4. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 2017, 26: 1674-1680.
129. Ravenhill BJ, Boyle KB, von Muhlinen N, Ellison CJ, Masson GR, Otten EG, Foeglein A, Williams R, Randow F. The Cargo Receptor NDP52 Initiates Selective Autophagy by Recruiting the ULK Complex to Cytosol-Invasive Bacteria. *Molecular cell*, 2019, 74: 320-329.e326.

130. Ren J, Liang R, Wang W, Zhang D, Yu L, Feng W. Multi-site-mediated entwining of the linear WIR-motif around WIPI β -propellers for autophagy. *Nature communications*, 2020, 11: 2702.
131. Ren X, Nguyen TN, Lam WK, Buffalo CZ, Lazarou M, Yokom AL, Hurley JH. Structural basis for ATG9A recruitment to the ULK1 complex in mitophagy initiation. *Science advances*, 2023, 9: eadg2997.
132. Rieder M, Brzózka K, Pfaller CK, Cox JH, Stitz L, Conzelmann KK. Genetic dissection of interferon-antagonistic functions of rabies virus phosphoprotein: inhibition of interferon regulatory factor 3 activation is important for pathogenicity. *Journal of virology*, 2011, 85: 842-852.
133. Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2009, 10: 398-409.
134. Saksena S, Sun J, Chu T, Emr SD. ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends in biochemical sciences*, 2007, 32: 561-573.
135. Sawa-Makarska J, Baumann V, Coudevylle N, von Bülow S, Nogellova V, Abert C, Schuschnig M, Graef M, Hummer G, Martens S. Reconstitution of autophagosome nucleation defines Atg9 vesicles as seeds for membrane formation. *Science (New York, N.Y.)*, 2020, 369.
136. Schoehn G, Iseni F, Mavrakis M, Blondel D, Ruigrok RW. Structure of recombinant rabies virus nucleoprotein-RNA complex and identification of the phosphoprotein binding site. *Journal of virology*, 2001, 75: 490-498.
137. Schuck S. Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *Journal of cell science*, 2020, 133.
138. Scott TP, Nel LH. Lyssaviruses and the Fatal Encephalitic Disease Rabies. *Frontiers in immunology*, 2021, 12: 786953.
139. Segura-Morales C, Pescia C, Chatellard-Causse C, Sadoul R, Bertrand E, Basyuk E. Tsg101 and Alix interact with murine leukemia virus Gag and cooperate with Nedd4 ubiquitin ligases during budding. *The Journal of biological chemistry*, 2005, 280: 27004-27012.
140. Shelly S, Lukinova N, Bambina S, Berman A, Cherry S. Autophagy is an essential component of Drosophila immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity*, 2009, 30: 588-598.
141. Smith JD, de Harven E. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. III. Cytochemical localization of lysosomal enzymes in infected cells. *Journal of virology*, 1978, 26: 102-109.
142. Smith MD, Harley ME, Kemp AJ, Wills J, Lee M, Arends M, von Kriegsheim A, Behrends C, Wilkinson S. CCPG1 Is a Non-canonical Autophagy Cargo Receptor Essential for ER-Phagy and Pancreatic ER Proteostasis. *Developmental cell*, 2018, 44: 217-232.e211.
143. Sonthonnax F, Besson B, Bonnaud E, Jouvion G, Merino D, Larrous F, Bourhy H. Lyssavirus matrix protein cooperates with phosphoprotein to modulate the Jak-Stat pathway. *Scientific reports*, 2019, 9: 12171.
144. Sou YS, Waguri S, Iwata J, Ueno T, Fujimura T, Hara T, Sawada N, Yamada A, Mizushima N, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M. The Atg8

- conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Molecular biology of the cell*, 2008, 19: 4762-4775.
145. Stanley RE, Ragusa MJ, Hurley JH. The beginning of the end: how scaffolds nucleate autophagosome biogenesis. *Trends in cell biology*, 2014, 24: 73-81.
146. Staub O, Dho S, Henry P, Correa J, Ishikawa T, McGlade J, Rotin D. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *The EMBO journal*, 1996, 15: 2371-2380.
147. Sudol M. Structure and function of the WW domain. *Progress in biophysics and molecular biology*, 1996, 65: 113-132.
148. Sumpter R, Jr., Sirasanagandla S, Fernández Á F, Wei Y, Dong X, Franco L, Zou Z, Marchal C, Lee MY, Clapp DW, Hanenberg H, Levine B. Fanconi Anemia Proteins Function in Mitophagy and Immunity. *Cell*, 2016, 165: 867-881.
149. Sun A, Wei J, Childress C, Shaw JHt, Peng K, Shao G, Yang W, Lin Q. The E3 ubiquitin ligase NEDD4 is an LC3-interactive protein and regulates autophagy. *Autophagy*, 2017, 13: 522-537.
150. Sundaramoorthy V, Green D, Locke K, O'Brien CM, Dearnley M, Bingham J. Novel role of SARM1 mediated axonal degeneration in the pathogenesis of rabies. *PLoS pathogens*, 2020, 16: e1008343.
151. Takahashi Y, He H, Tang Z, Hattori T, Liu Y, Young MM, Serfass JM, Chen L, Gebru M, Chen C, Wills CA, Atkinson JM, Chen H, Abraham T, Wang HG. An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nature communications*, 2018, 9: 2855.
152. Tallóczy Z, Virgin HWt, Levine B. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy*, 2006, 2: 24-29.
153. Taylor GM, Hanson PI, Kielian M. Ubiquitin depletion and dominant-negative VPS4 inhibit rhabdovirus budding without affecting alphavirus budding. *Journal of virology*, 2007, 81: 13631-13639.
154. Teodorof-Diedrich C, Spector SA. Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 and Tat Induce Mitochondrial Fragmentation and Incomplete Mitophagy in Human Neurons. *Journal of virology*, 2018, 92.
155. Thangaraj A, Periyasamy P, Liao K, Bendi VS, Callen S, Pendyala G, Buch S. HIV-1 TAT-mediated microglial activation: role of mitochondrial dysfunction and defective mitophagy. *Autophagy*, 2018, 14: 1596-1619.
156. Thoulouze MI, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *Journal of virology*, 1998, 72: 7181-7190.
157. Tian D, Luo Z, Zhou M, Li M, Yu L, Wang C, Yuan J, Li F, Tian B, Sui B, Chen H, Fu ZF, Zhao L. Critical Role of K1685 and K1829 in the Large Protein of Rabies Virus in Viral Pathogenicity and Immune Evasion. *Journal of virology*, 2016, 90: 232-244.

158. Toyoda T, An D, Witczak CA, Koh HJ, Hirshman MF, Fujii N, Goodyear LJ. Myo1c regulates glucose uptake in mouse skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, 2011, 286: 4133-4140.
159. Trotman LC, Wang X, Alimonti A, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Yang H, Pavletich NP, Carver BS, Cordon-Cardo C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chi SG, Kim HJ, Misteli T, Jiang X, Pandolfi PP. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell*, 2007, 128: 141-156.
160. Tsiang H, Ceccaldi PE, Lycke E. Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. *The Journal of general virology*, 1991, 72 (Pt 5): 1191-1194.
161. Tsuboyama K, Koyama-Honda I, Sakamaki Y, Koike M, Morishita H, Mizushima N. The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science (New York, N.Y.)*, 2016, 354: 1036-1041.
162. Tuffereau C, Bénéjean J, Blondel D, Kieffer B, Flamand A. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *The EMBO journal*, 1998, 17: 7250-7259.
163. Turco E, Witt M, Abert C, Bock-Bierbaum T, Su MY, Trapannone R, Sztacho M, Danieli A, Shi X, Zaffagnini G, Gamper A, Schuschnig M, Fracchiolla D, Bernklau D, Romanov J, Hartl M, Hurley JH, Daumke O, Martens S. FIP200 Claw Domain Binding to p62 Promotes Autophagosome Formation at Ubiquitin Condensates. *Molecular cell*, 2019, 74: 330-346.e311.
164. Turco E, Savova A, Gere F, Ferrari L, Romanov J, Schuschnig M, Martens S. Reconstitution defines the roles of p62, NBR1 and TAX1BP1 in ubiquitin condensate formation and autophagy initiation. *Nature communications*, 2021, 12: 5212.
165. Uemura T, Yamamoto M, Kametaka A, Sou YS, Yabashi A, Yamada A, Annoh H, Kametaka S, Komatsu M, Waguri S. A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum to autophagic isolation membrane. *Molecular and cellular biology*, 2014, 34: 1695-1706.
166. Ugolini G. Rabies virus as a transneuronal tracer of neuronal connections. *Advances in virus research*, 2011, 79: 165-202.
167. Valverde DP, Yu S, Boggavarapu V, Kumar N, Lees JA, Walz T, Reinisch KM, Melia TJ. ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *The Journal of cell biology*, 2019, 218: 1787-1798.
168. Vana ML, Tang Y, Chen A, Medina G, Carter C, Leis J. Role of Nedd4 and ubiquitination of Rous sarcoma virus Gag in budding of virus-like particles from cells. *Journal of virology*, 2004, 78: 13943-13953.
169. Vargas JNS, Wang C, Bunker E, Hao L, Maric D, Schiavo G, Randow F, Youle RJ. Spatiotemporal Control of ULK1 Activation by NDP52 and TBK1 during Selective Autophagy. *Molecular cell*, 2019, 74: 347-362.e346.
170. Vilmen G, Glon D, Siracusano G, Lussignol M, Shao Z, Hernandez E, Perdiz D, Quignon F, Mouna L, Poüs C, Gruffat H, Maréchal V, Esclatine A. BHRF1,

- a BCL2 viral homolog, disturbs mitochondrial dynamics and stimulates mitophagy to dampen type I IFN induction. *Autophagy*, 2021, 17: 1296-1315.
171. Vo MT, Smith BJ, Nicholas J, Choi YB. Activation of NIX-mediated mitophagy by an interferon regulatory factor homologue of human herpesvirus. *Nature communications*, 2019, 10: 3203.
172. Votteler J, Sundquist WI. Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell host & microbe*, 2013, 14: 232-241.
173. Wang H, Sun HQ, Zhu X, Zhang L, Albanesi J, Levine B, Yin H. GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112: 7015-7020.
174. Wang J, Wang Z, Liu R, Shuai L, Wang X, Luo J, Wang C, Chen W, Wang X, Ge J, He X, Wen Z, Bu Z. Metabotropic glutamate receptor subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus. *PLoS pathogens*, 2018, 14: e1007189.
175. Wang R, Zhu Y, Lin X, Ren C, Zhao J, Wang F, Gao X, Xiao R, Zhao L, Chen H, Jin M, Ma W, Zhou H. Influenza M2 protein regulates MAVS-mediated signaling pathway through interacting with MAVS and increasing ROS production. *Autophagy*, 2019, 15: 1163-1181.
176. Wang R, Zhu Y, Ren C, Yang S, Tian S, Chen H, Jin M, Zhou H. Influenza A virus protein PB1-F2 impairs innate immunity by inducing mitophagy. *Autophagy*, 2021a, 17: 496-511.
177. Wang X, Trotman LC, Koppie T, Alimonti A, Chen Z, Gao Z, Wang J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP, Jiang X. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*, 2007, 128: 129-139.
178. Wang Y, Sharma P, Jefferson M, Zhang W, Bone B, Kipar A, Bitto D, Coombes JL, Pearson T, Man A, Zhekova A, Bao Y, Tripp RA, Carding SR, Yamauchi Y, Mayer U, Powell PP, Stewart JP, Wileman T. Non-canonical autophagy functions of ATG16L1 in epithelial cells limit lethal infection by influenza A virus. *The EMBO journal*, 2021b, 40: e105543.
179. Wang Z, Miao G, Xue X, Guo X, Yuan C, Wang Z, Zhang G, Chen Y, Feng D, Hu J, Zhang H. The Vici Syndrome Protein EPG5 Is a Rab7 Effector that Determines the Fusion Specificity of Autophagosomes with Late Endosomes/Lysosomes. *Molecular cell*, 2016, 63: 781-795.
180. Wang Z, Yuan Y, Zhang Y, Zhang C, Sui B, Zhao J, Zhou M, Chen H, Fu ZF, Zhao L. Substitution of S179P in the Lyssavirus Phosphoprotein Impairs Its Interferon Antagonistic Function. *Journal of virology*, 2022, 96: e0112522.
181. Wirblich C, Tan GS, Papaneri A, Godlewski PJ, Orenstein JM, Harty RN, Schnell MJ. PPEY motif within the rabies virus (RV) matrix protein is essential for efficient virion release and RV pathogenicity. *Journal of virology*, 2008, 82: 9730-9738.
182. Yamamoto H, Fujioka Y, Suzuki SW, Noshiro D, Suzuki H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Ando T, Noda NN, Ohsumi Y. The Intrinsically

- Disordered Protein Atg13 Mediates Supramolecular Assembly of Autophagy Initiation Complexes. *Developmental cell*, 2016, 38: 86-99.
183. Yamano K, Kikuchi R, Kojima W, Hayashida R, Koyano F, Kawawaki J, Shoda T, Demizu Y, Naito M, Tanaka K, Matsuda N. Critical role of mitochondrial ubiquitination and the OPTN-ATG9A axis in mitophagy. *The Journal of cell biology*, 2020, 219.
184. Yang B, Gay DL, MacLeod MK, Cao X, Hala T, Sweezer EM, Kappler J, Marrack P, Oliver PM. Nedd4 augments the adaptive immune response by promoting ubiquitin-mediated degradation of Cbl-b in activated T cells. *Nature immunology*, 2008, 9: 1356-1363.
185. Yasuda J, Nakao M, Kawaoka Y, Shida H. Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *Journal of virology*, 2003, 77: 9987-9992.
186. Yip MF, Ramm G, Larance M, Hoehn KL, Wagner MC, Guilhaus M, James DE. CaMKII-mediated phosphorylation of the myosin motor Myo1c is required for insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Cell metabolism*, 2008, 8: 384-398.
187. Zadro C, Alemanno MS, Bellacchio E, Ficarella R, Donaudy F, Melchionda S, Zelante L, Rabionet R, Hilgert N, Estivill X, Van Camp G, Gasparini P, Carella M. Are MYO1C and MYO1F associated with hearing loss? *Biochimica et biophysica acta*, 2009, 1792: 27-32.
188. Zan J, Liu S, Sun DN, Mo KK, Yan Y, Liu J, Hu BL, Gu JY, Liao M, Zhou JY. Rabies Virus Infection Induces Microtubule Depolymerization to Facilitate Viral RNA Synthesis by Upregulating HDAC6. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2017, 7: 146.
189. Zeng Y, Xu S, Wei Y, Zhang X, Wang Q, Jia Y, Wang W, Han L, Chen Z, Wang Z, Zhang B, Chen H, Lei CQ, Zhu Q. The PB1 protein of influenza A virus inhibits the innate immune response by targeting MAVS for NBR1-mediated selective autophagic degradation. *PLoS pathogens*, 2021, 17: e1009300.
190. Zhang Y, Jiang X, Deng Q, Gao Z, Tang X, Fu R, Hu J, Li Y, Li L, Gao N. Downregulation of MYO1C mediated by cepharanthine inhibits autophagosome-lysosome fusion through blockade of the F-actin network. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 2019, 38: 457.
191. Zhen Y, Spangenberg H, Munson MJ, Brech A, Schink KO, Tan KW, Sørensen V, Wenzel EM, Radulovic M, Engedal N, Simonsen A, Raiborg C, Stenmark H. ESCRT-mediated phagophore sealing during mitophagy. *Autophagy*, 2020, 16: 826-841.
192. Zheng JX, Li Y, Ding YH, Liu JJ, Zhang MJ, Dong MQ, Wang HW, Yu L. Architecture of the ATG2B-WDR45 complex and an aromatic Y/HF motif crucial for complex formation. *Autophagy*, 2017, 13: 1870-1883.
193. Zhou F, Wu Z, Zhao M, Murtazina R, Cai J, Zhang A, Li R, Sun D, Li W, Zhao L, Li Q, Zhu J, Cong X, Zhou Y, Xie Z, Gyurkovska V, Li L, Huang X, Xue Y, Chen L, *et al.* Rab5-dependent autophagosome closure by ESCRT. *The Journal of cell biology*, 2019, 218: 1908-1927.

194. Zhou Z, Liu J, Fu T, Wu P, Peng C, Gong X, Wang Y, Zhang M, Li Y, Wang Y, Xu X, Li M, Pan L. Phosphorylation regulates the binding of autophagy receptors to FIP200 Claw domain for selective autophagy initiation. *Nature communications*, 2021, 12: 1570.