

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21620120153765

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

博 士 学 位 论 文

**Gasdermin D 参与执行细胞焦亡  
并影响白介素 1 $\beta$  分泌**

**Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for  
interleukin-1 secretion**

何琬婷

指导教师姓名: 韩家淮 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2015 年 11 月

论文答辩时间: 2015 年 12 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 吴乔 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2015 年 12 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

## 摘要

炎症小体是先天免疫系统中一类重要的胞内信号复合体。炎症小体的激活可以引发白介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和白介素 18 (IL-18) 的成熟和分泌, 同时引发细胞焦亡。Caspase-1 和 caspase-11(人源同源蛋白 caspase-4/5) 分别在经典炎症小体和非经典炎症小体信号通路中起关键作用。本实验中, 我们通过利用高灵敏度定量质谱技术, 发现蛋白 gasdermin D (GSDMD) 是炎症小体复合物的另一重要组成成分, 它会随着 NLRP3 炎症小体激活剂的刺激进入炎症小体复合体。我们通过敲除 GSDMD 基因, 证明了 GSDMD 蛋白在经典和非经典炎症小体诱发的细胞焦亡中均起到关键作用, 并影响着 IL-1 $\beta$  的分泌, 但是, GSDMD 并不影响 IL-1 $\beta$  的剪切成熟。实验证明, GSDMD 经 caspase-1 剪切产生的氮端片段, 可以引发细胞死亡, 并且氮端标签蛋白的添加, 会阻碍 GSDMD 行使细胞死亡的功能。同时, 我们发现前体 caspase-1 具有剪切激活 GSDMD 的活性, 而且该过程可以不依赖于 ASC 接头蛋白的协助。进一步实验表明, LPS 加 Nigericin 或者 *S. typhimurium* 的刺激会使 GSDMD 缺失的巨噬细胞出现细胞凋亡的现象, 说明细胞凋亡可能被细胞焦亡的发生所压制。此时发生的细胞凋亡依赖于 NLRP3 和 ASC 的存在, 而 caspase-1 的存在对这一过程可能有部分贡献。实验结果表明, 细胞凋亡和细胞焦亡之间的相互转换可能存在着一些未知的调控机制。

**关键词:** GSDMD; 炎症小体; 细胞焦亡; 细胞凋亡; 白介素 1 $\beta$ ; 半胱天冬酶 1; 半胱天冬酶 11。

## Abstract

Inflammasome is an intracellular signaling complex of innate immune system. Activation of inflammasomes promotes the secretion of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 and triggers pyroptosis. Caspase-1 and -11 (or -4/5 in human) in the canonical and non-canonical inflammasome pathways respectively, are crucial for inflammasome-mediated inflammatory responses. Here we report that gasdermin D (GSDMD) is another crucial component of inflammasomes. We discovered the presence of GSDMD protein in nigericin-induced NLRP3 inflammasomes by a quantitative MS-based analysis. Gene deletion of GSDMD demonstrated that GSDMD is required for pyroptosis and for the secretion but not proteolytic maturation of IL-1 $\beta$  in both canonical and non-canonical inflammasome responses. It was known that GSDMD is a substrate of caspase-1 and we showed its cleavage at the predicted site during inflammasome activation and that this cleavage was required for pyroptosis and IL-1 $\beta$  secretion. Expression of the N-terminal proteolytic fragment of GSDMD can trigger cell death and N-terminal modification such as tagging with Flag sequence disrupted the function of GSDMD. We also found that pro-caspase-1 is capable of processing GSDMD and ASC is not essential for GSDMD to function. Further analyses of LPS plus nigericin- or *S. typhimurium*-treated macrophage cell lines and primary cells showed that apoptosis became apparent in *Gsdmd*<sup>-/-</sup> cells, indicating a suppression of apoptosis by pyroptosis. The induction of apoptosis required NLRP3 or other inflammasome receptors and ASC, and caspase-1 may partially contribute to the activation of apoptotic caspases in *Gsdmd*<sup>-/-</sup> cells. These data provided new insights into the molecular mechanisms of pyroptosis and revealed an unexpected interplay between apoptosis and pyroptosis.

**Keywords:** GSDMD; inflammasome; pyroptosis; apoptosis; IL-1 $\beta$ ; caspase-1; caspase-11.

摘要 .....	I
Abstract .....	II
<b>第一章 前言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 炎症小体.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 炎症小体简介.....	1
1.1.2 炎症小体分类概述.....	2
1.1.3 炎症小体相关蛋白的主要结构域简介.....	7
<b>1.2 细胞焦亡.....</b>	<b>8</b>
1.2.1 细胞焦亡的形态学概述.....	8
1.2.2 细胞焦亡的调控机制和抑制途径.....	10
1.2.3 细胞焦亡的检测指标.....	10
1.2.4 细胞焦亡的生理意义.....	11
1.2.5 细胞焦亡与炎症小体之间的关系.....	12
1.2.6 细胞焦亡与其他细胞死亡之间的相互转换.....	14
<b>1.3 IL-1<math>\beta</math> 与 IL-18 .....</b>	<b>15</b>
1.3.1 IL-1 细胞因子在免疫反应中的作用 .....	16
1.3.2 IL-1 $\beta$ .....	16
1.3.3 IL-18 (IL-1F4) .....	18
<b>1.4 Gasdermin 家族 .....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Gasdermin 家族成员简介 .....	19
1.4.2 Gasdermin 家族成员蛋白序列分析 .....	22
1.4.3 Gasdermin 家族成员在机体中的表达分布 .....	22
<b>1.5 立题背景 .....</b>	<b>23</b>
<b>第二章 材料与方法 .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 药品, 试剂和仪器 .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 DNA 相关实验及其操作方法 .....</b>	<b>25</b>
2.2.1 真核细胞表达系统.....	25
2.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	26
2.2.3 质粒 DNA 转化.....	27
2.2.4 提取质粒 DNA.....	27
2.2.5 聚合酶链式扩增反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	31
2.2.6 DNA 分离与纯化.....	31
2.2.7 T4 DNA 连接反应.....	32
2.2.8 非连接酶依赖型克隆 (Ligation Independent Cloning, LIC) .....	

.....	32
<b>2.3 细胞的分离、培养及相关实验操作方法</b> .....	<b>33</b>
2.3.1 细胞培养.....	33
2.3.2 细胞的瞬时转染.....	34
2.3.3 慢病毒感染细胞.....	34
<b>2.4 蛋白质免疫印迹及蛋白的分离与纯化</b> .....	<b>36</b>
2.4.1 蛋白质 SDS-PAGE 电泳及免疫印迹.....	36
2.4.2 蛋白免疫沉淀 (Immunoprecipitation).....	37
2.4.3 Flag 标签免疫沉淀蛋白复合体的洗脱.....	38
2.4.4 TCA 法沉淀富集胞外释放蛋白.....	38
<b>2.5 Knock out 细胞系制备</b> .....	<b>39</b>
2.5.1 构建 CRISPR-Cas9 克隆.....	39
<b>2.6 炎症小体的激活</b> .....	<b>41</b>
<b>2.7 细胞毒性试验及 IL-1<math>\beta</math> ELISA 定量检测</b> .....	<b>41</b>
<b>2.8 Caspase 剪切酶体 3/7 和 8 的活性测定</b> .....	<b>41</b>
<b>2.9 细胞死亡的显微成像实验</b> .....	<b>42</b>
<b>第三章 结果与讨论</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1 结果</b> .....	<b>43</b>
3.1.1 制作 NLRP3-3 $\times$ Flag 重建 J774 细胞系和 RAW-ASC 细胞系.....	43
3.1.2 利用高灵敏度定量质谱鉴定出一些尚未报道的 NLRP3 相互作用蛋白.....	45
3.1.3 GSDMD 是细胞焦亡发生所必需的关键蛋白.....	48
3.1.4 GSDMD 参与调控 IL-1 $\beta$ 的分泌.....	49
3.1.5 在 BMDM 和 J774 细胞中验证 GSDMD 的功能.....	50
3.1.6 GSDMD 也参与调控 NLRP1b, NLRC4, Caspase-11 介导的细胞焦亡和 IL-1 $\beta$ 分泌.....	52
3.1.7 GSDMD 对于 caspase-1 前体蛋白的自剪切作用以及 IL-1 $\beta$ 的剪切加工没有影响.....	53
3.1.8 Caspase-1 对 GSDMD 的剪切加工, 是细胞焦亡的发生与 IL-1 $\beta$ 分泌的必要步骤.....	54
3.1.9 GSDMD 经蛋白酶解产生的氮端片段能诱导细胞焦亡的发生.....	56
3.1.10 Caspase-1 的前体蛋白可以行使对 GSDMD 的剪切, 并且不依赖于 ASC 接头蛋白的协助.....	57
3.1.11 GSDMD 的缺失, 会凸显出炎症小体介导的细胞凋亡的效应.....	61
3.1.12 GSDMD 在炎症小体中的作用模型.....	67
<b>3.2 讨论</b> .....	<b>69</b>
<b>附录 1 图表索引</b> .....	<b>72</b>

附录 2 缩略语及中英文对照 .....	74
参考文献 .....	75-82
致谢 .....	83

厦门大学博硕士论文摘要库



## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>II</b>
<b>Chapter One Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Inflammasome</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Introduction of inflammasome.....	1
1.1.2 Different subsets of inflammasomes.....	2
1.1.3 Functional domains in inflammasome signaling pathway..	7
<b>1.2 Pyroptosis</b> .....	<b>8</b>
1.2.1 Morphology of pyroptosis.....	8
1.2.2 The molecular mechanism of pyroptosis.....	10
1.2.3 The detection of pyroptosis.....	10
1.2.4 The physiological significance of pyroptosis.....	11
1.2.5 The regulation and relation between pyroptosis and inflammasome.....	12
1.2.6 Potential cross-talk between pyroptosis and other cell death pathways.....	14
<b>1.3 IL-1 <math>\beta</math> and IL-18</b> .....	<b>15</b>
1.3.1 The role of IL-1 in inflammation.....	16
1.3.2 IL-1 $\beta$ .....	16
1.3.3 IL-18 (IL-1F4) .....	18
<b>1.4 Gasdermin family</b> .....	<b>19</b>
1.4.1 Introduction of the members of Gasdermin family.....	19
1.4.2 Analysis of amino acid sequences of Gasdermin family members.....	22
1.4.3 Gsdm family genes show tissue-specific and linear expression in vivo.....	22
<b>1.5 Background of this thesis</b> .....	<b>23</b>
<b>Chapter Two Materials and methods</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Drugs, reagents and equipments</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 Experiments and methods for DNA</b> .....	<b>25</b>
2.2.1 Plasmid vector.....	25
2.2.2 Preparation of E.Coli competent cells.....	26
2.2.3 DNA transformation.....	27
2.2.4 Preparation of plasmid DNA.....	27

2.2.5	DNA amplification by polymerase chain reaction.....	30
2.2.6	Recovery and separation of DNA.....	31
2.2.7	DNA ligation.....	32
2.2.8	Ligation Independent Cloning (LIC) .....	32
<b>2.3</b>	<b>Experiments and methods for cell.....</b>	<b>33</b>
2.3.1	Cell culture.....	33
2.3.2	Transfection method.....	33
2.3.3	Lentivirus packaging and infection method.....	34
<b>2.4</b>	<b>Experiments and methods for protein.....</b>	<b>36</b>
2.4.1	SDS-PAGE electrophoresis and western blot analysis ..	36
2.4.2	Immunoprecipitation.....	37
2.4.3	Elution of CoIP proteins from M2 anti-Flag agarose....	38
2.4.4	Precipitate supernatant protein with TCA.....	38
<b>2.5</b>	<b>Generation of knockout cell lines.....</b>	<b>39</b>
2.5.1	CRISPR-Cas9 clones construction.....	39
<b>2.6</b>	<b>Inflammasome assays.....</b>	<b>41</b>
<b>2.7</b>	<b>Cytotoxicity assay and IL-1<math>\beta</math> ELISA.....</b>	<b>41</b>
<b>2.8</b>	<b>Caspase 剪切酶体 3/7 和 8 的活性测定 .....</b>	<b>41</b>
<b>2.9</b>	<b>Measurement of Caspase-3, 7 and 8 activity.....</b>	<b>41</b>
<b>Chapter Three</b>	<b>Results and discussion.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Results.....</b>	<b>43</b>
3.1.1	Generation of NLRP3-3 $\times$ Flag reconstituted J774 cell line and RAW-ASC cell line.....	43
3.1.2	Identify new components of inflammasomes by high-sensitive quantitative mass spectrometry (MS).....	45
3.1.3	GSDMD is a required component of NLRP3 inflammasome for pyroptosis.....	48
3.1.4	GSDMD is required for IL-1 $\beta$ secretion.....	49
3.1.5	Confirm the functions of GSDMD in BMDM and J774 cell line .....	50
3.1.6	GSDMD is required in NLRP1b, NLRC4, Caspase-11 depended pyroptosis and IL-1 $\beta$ secretion.....	52
3.1.7	GSDMD has no effect on pro-caspase-1 auto-processing and caspase-1-mediated maturation of IL-1 $\beta$ .....	53
3.1.8	Cleavage of GSDMD by caspase-1 is required for pyroptosis and release of matured IL-1 outside of cells.....	54
3.1.9	N-terminal proteolytic fragment of GSDMD triggers pyroptosis.....	56
3.1.10	GSDMD cleavage can be mediated by pro-caspase-1 and does	

---

not need ASC.....	57
3.1.11 Depletion of GSDMD unmasks inflammasome-induced apoptosis.....	61
3.1.12 Model of how GSDMD function in inflammasomes.....	67
<b>3.2 Discussion.....</b>	<b>69</b>
<b>Appendix I Index of figures and tables.....</b>	<b>72</b>
<b>Appendix II Abbreviations.....</b>	<b>74</b>
<b>References .....</b>	<b>75-82</b>

## 第一章 前言

### 1.1 炎症小体

#### 1.1.1 炎症小体简介

炎症小体是一类细胞内由多种蛋白构成的大型复合体,炎症小体的形成可以有效激活 caspase-1 (半胱天冬酶 1), 继而通过 caspase-1 的蛋白水解酶活性, 对 IL-1 $\beta$  (白介素 1 $\beta$ ) 和 IL-18 (白介素 18) 进行剪切加工, 使得成熟的 IL-1 $\beta$  和 IL-18 释放到细胞外。与此同时, 炎症小体的激活伴随发生细胞焦亡。炎症小体的激活是先天免疫系统中至关重要的组成部分, 它能够通过白介素的释放激起免疫系统应答, 进而帮助宿主有效抵抗病原菌、病毒的侵扰。然而由于失调而过度激活的炎症小体又会导致一系列自发炎症和自身免疫疾病的发生<sup>[1]</sup>。

炎症小体的主要组成成分包括: 一系列胞内模式识别受体 (PRRs); ASC 接头蛋白; caspase-1。

模式识别受体是指可以识别特定 PAMPs (病原相关分子模式) 和 DAMPs (危险相关分子模式) 的受体蛋白。模式识别受体可以根据它在细胞内的定位分为两大类, 一类如 Toll-like receptors (TLRs) 具有跨膜结构域, 在细胞内定位于细胞膜或者内吞体膜上, 可识别细胞外环境中的 PAMPs 和 DAMPs。另一类, 定位于细胞质中, 可识别细胞内的 PAMPs 和 DAMPs, 这一类模式识别受体包括 RIG-I-like receptor (RLR), the AIM2-like receptor (ALR), and the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing (NLR) proteins<sup>[2]</sup>。其中, NLRP1b、NLRP3、NLRC4、AIM2 等, 是迄今为止研究较为充分的参与炎症小体组成的模式识别受体。

ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) 是一个具有 PYD 结构域和 CARD 结构域的双边接头蛋白。其主要功能是帮助没有 CARD 结构域的模式识别受体募集 caspase-1<sup>[3]</sup>。

Caspase-1 属于半胱天冬酶家族, 它在静息状态下以酶原形式存在。在特定 PAMPs 和 DAMPs 的刺激下, 能够被相应的模式识别受体通过 ASC 或者直接募集进入炎症小体复合体中, 之后通过自剪切活性, 切去 CARD 功能域, 从酶原形式变

为有活性的蛋白酶。继而行使对 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的剪切功能<sup>[1]</sup>。

### 1.1.2 炎症小体分类概述

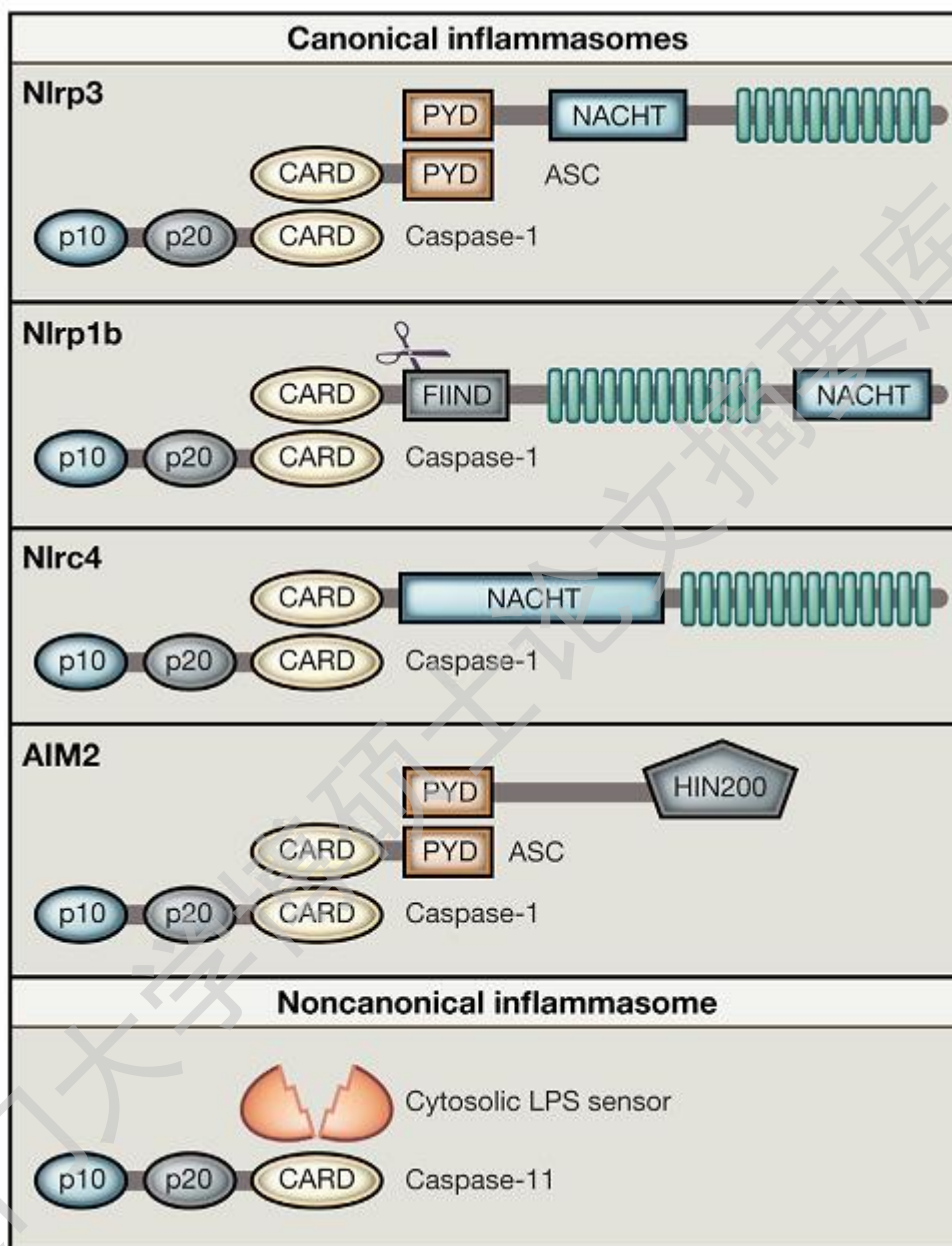


图 1. 1 经典和非经典炎症小体的关键组成蛋白示意图

Fig1.1 Composition of Canonical and Noncanonical Inflammasomes<sup>[115]</sup>

#### 1.1.2.1 NLRP3 炎症小体

NLRP3 炎症小体，是一类研究最为广泛深入的炎症小体，NLRP3 受体蛋白由 PYD 功能域，NACHT 功能域和 LRR 功能域组成，由于不具有 CARD 功能域，NLRP3 对 caspase-1 的招募需要通过 ASC 接头蛋白的帮助（图 1.1）。

NLRP3 炎症小体的激活，需要两级信号刺激依次作用。第一级信号刺激，由 Toll-like receptors 或 TNF 信号通路激发 NF- $\kappa$ B 活性，介导 IL-1 $\beta$  和 NLRP3 蛋白的大量表达，为炎症小体的激活做准备<sup>[4]</sup>。第二级信号刺激，为激活信号，可以激发炎症小体的聚集。

包括细菌、病毒、真菌、离子载体毒素、晶体、淀粉样沉淀、ATP 等许多种 PAMPs 和 DAMPs 均可以作为第二级信号，激活 NLRP3 炎症小体。NLRP3 炎症小体激活机制的相关假说包括：钾离子外流；NLRP3 蛋白迁移至线粒体；线粒体 ROS 的产生；线粒体 DNA 或线粒体磷脂双磷脂酰甘油的释放。而其具体的激活机制，却至今尚未研究清楚<sup>[1]</sup>（图 1.2）。

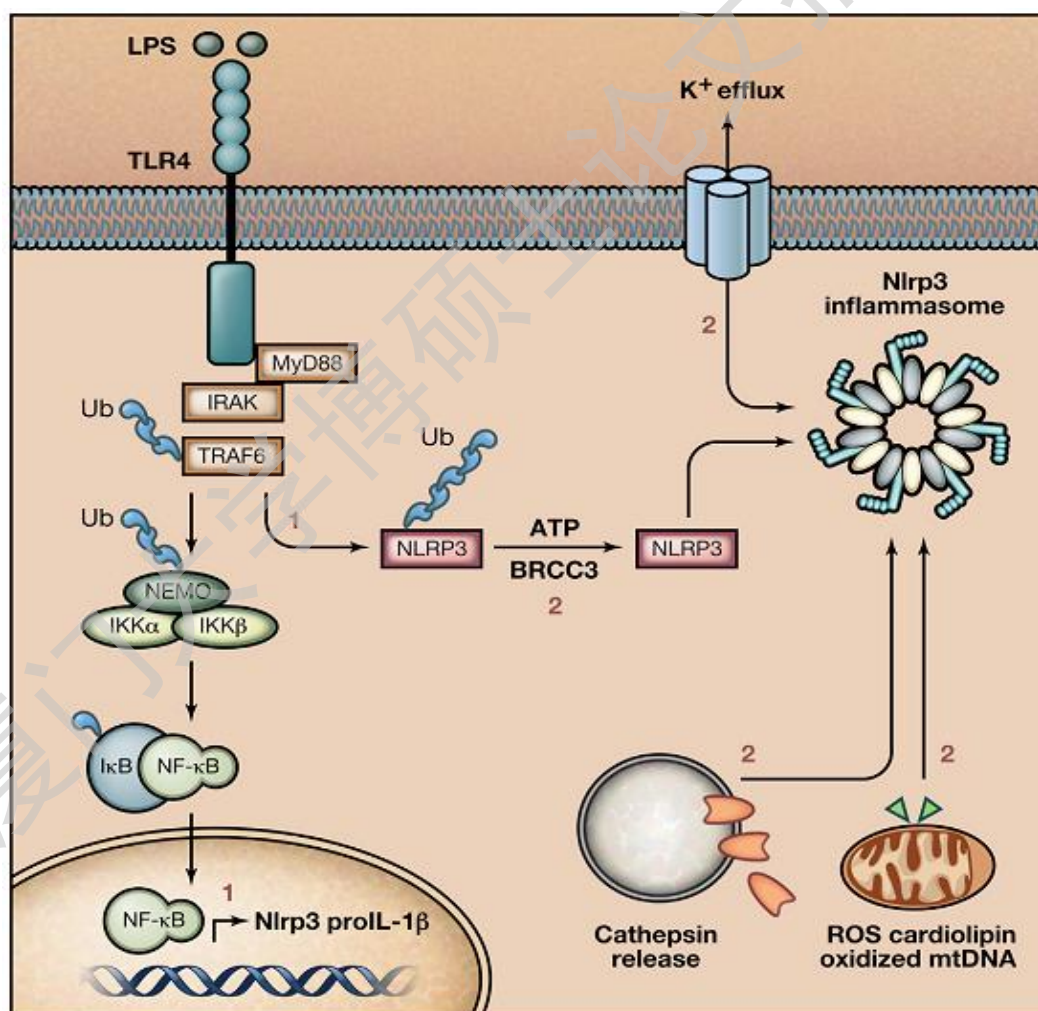


图 1. 2 NLRP3 炎症小体预处理和激活信号图解

Fig1.2 Priming and Activation Signals of the Nlrp3 Inflammasome<sup>[115]</sup>

一系列自发炎症、自身免疫疾病，如冷吡啉相关周期性综合征（CAPS）跟 NLRP3 炎症小体的过量激活有强烈的相关性<sup>[5, 6]</sup>。此外，过量激活的 NLRP3 炎症小体会增强机体对克罗恩病（Crohn's disease）的敏感性<sup>[7]</sup>，也会加剧阿尔茨海默综合征的病情<sup>[8]</sup>。

### 1.1.2.2 NLRC4 炎症小体

NLRC4 炎症小体，是由 NLRC4 受体蛋白作为模式识别受体，组成的炎症小体。NLRC4 受体蛋白由 CARD 功能域、NACHT 功能域和 LRR 功能域组成。NLRC4 受体蛋白可以通过自身的 CARD 功能域与 caspase-1 的 CARD 功能域直接相互作用，因此由 NLRC4 介导的细胞焦亡不需要 ASC 接头蛋白的参与。但是，NLRC4 炎症小体只有在 ASC 的帮助下才能募集大量的 caspase-1 前体蛋白，继而前体 caspase-1 发生自剪切，产生成熟的具有酶活的 caspase-1。

能够激起 NLRC4 受体蛋白活性的是病原菌的两类关键组分：鞭毛蛋白；三型或四型分泌系统相关蛋白。其中三型或四型分泌系统是帮助病原菌将毒力因子导入宿主细胞的病原菌大型复合物<sup>[9]</sup>。

包括鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhimurium*)、弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、伯克氏菌 (*Burkholderia thailandensis*) 和嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) 在内的许多胞内致病菌，均能激起 NLRC4 炎症小体的活性<sup>[10]</sup>。

当病原菌的鞭毛蛋白或分泌系统相关蛋白进入宿主细胞后，宿主细胞内的 NAIP 家族蛋白，可以有效识别这两类病原菌蛋白，一旦 NAIP 家族蛋白捕获相应的细菌蛋白，NAIP 家族蛋白就可以和 NLRC4 受体蛋白相互结合，并激活 NLRC4 受体蛋白，促使炎症小体的形成<sup>[10]</sup>（图 1.3）。

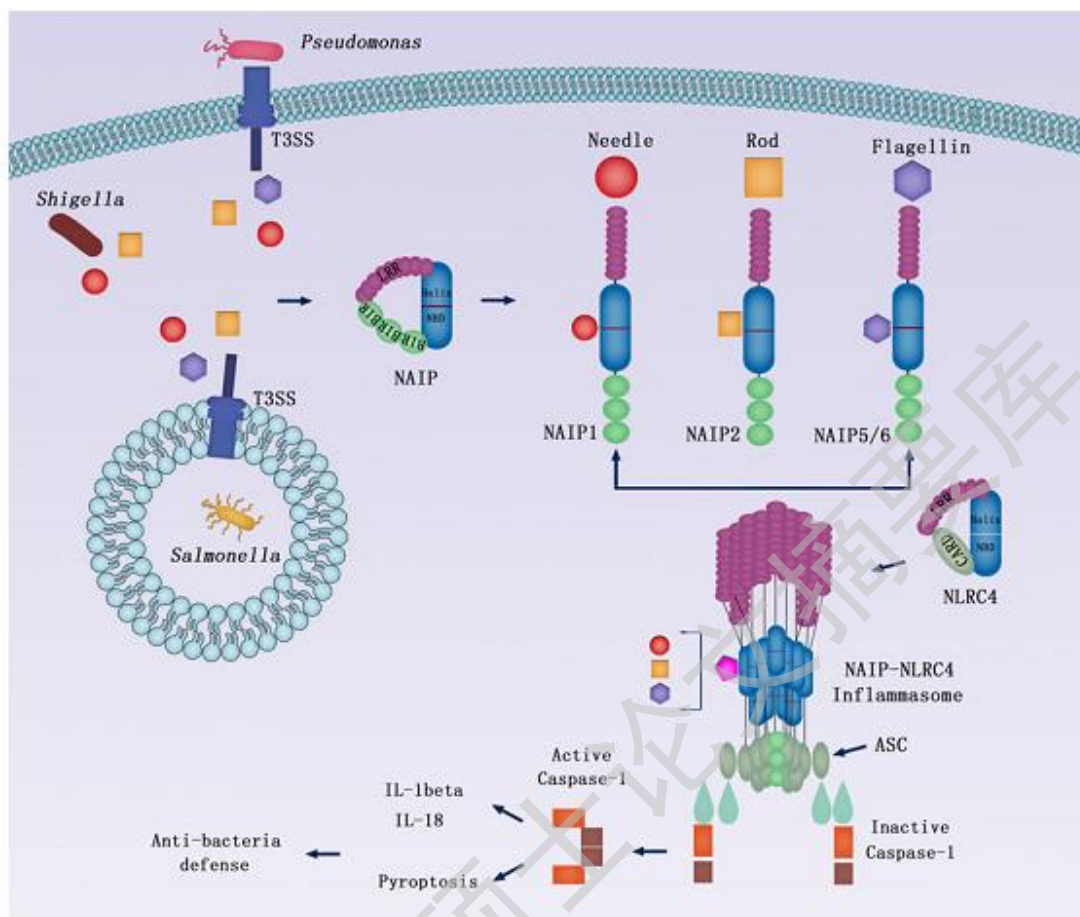


图 1. 3 NAIP-NLRC4 炎症小体抗菌机制模式图

Fig 1.3 Model of the NAIP - NLRC4 inflammasome in anti-bacteria defenses<sup>[116]</sup>

此外，研究表明 NLRC4 受体蛋白 Ser533 位的磷酸化也是 NLRC4 炎症小体激活的必要条件<sup>[11]</sup>。

### 1.1.2.3 NLRP1b 炎症小体

NLRP1b 炎症小体能帮助机体抵御炭疽杆菌的侵袭。LeTx（炭疽杆菌致死毒素）可以有效地激活 NLRP1b 炎症小体的活性。

LeTx（炭疽杆菌致死毒素）由 PA（protective antigen 保护抗原）和 LF（lethal factor 致死因子）两部分组成，其中 PA 能协助具有细胞杀伤毒性的 LF 进入宿主细胞。

当 LeTx 进入宿主细胞之后，在 NLRP1b 蛋白的 FIIND 结构域内会发生自剪切，继而 NLRP1b 受体蛋白被激活。（Proteolytic Processing of Nlrp1b Is Required for



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库