

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620121152366

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

MLKL 通过负调控 Toll 样受体信号通路
抑制细胞内炎症反应

MLKL limits inflammatory responses through
negatively regulating Toll-like receptor signaling pathway

庄秋宇

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 05 月

论文答辩时间: 2015 年 05 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 05 月

MLKL 通过负调控 Toll 样受体信号通路抑制细胞内炎症反应

庄秋宇

指导教师: 韩家淮教授

厦门大学

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）：

摘 要

炎症是机体清除有害刺激时做出的保护性反应，同时也是修复受损组织的一个过程。先天性免疫对微生物感染、组织损伤等造成的炎症起到了重要作用。但是，先天性免疫信号必须经过严格的调控，才能避免过于强烈的炎症反应对机体造成的不必要的伤害。Toll样受体在宿主识别病原体的入侵、激活炎症反应的过程中发挥了关键作用，因此，关于Toll样受体信号通路的负调控的研究显得尤为重要。本论文的研究发现，混合系蛋白激酶样结构域蛋白（mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL）通过负调控Toll样受体信号通路抑制细胞内炎症反应。MLKL是肿瘤坏死因子诱导的细胞坏死过程中的关键蛋白。在研究MLKL的功能时我们发现，在小鼠胚胎成纤维细胞中，MLKL的缺失导致脂多糖（LPS）和聚肌苷酸胞苷酸（poly I:C）介导产生的细胞因子与野生型细胞相比显著增加，并且导致了Toll样受体下游的NF- κ B和MAPKs信号强烈激活。进一步的研究表明，过表达MLKL可以抑制NF- κ B和AP-1的转录活性，且这一抑制作用对于TGF- β 激活激酶1（TGF- β -activated kinase 1, TAK1）激活的NF- κ B和AP-1的转录活性尤其明显。TAK1是Toll样受体信号通路中的关键蛋白，可以通过磷酸化下游蛋白将信号分别传递给NF- κ B和AP-1这两个转录因子。我们的研究还发现，MLKL可以与TAK1发生相互作用，该相互作用在LPS刺激下发生变化，并且MLKL使TAK1的蛋白稳定性降低。我们的工作首次阐明了，除了执行细胞坏死的功能以外，MLKL在先天性免疫信号通路中也发挥了重要的调节作用。这一负调控炎症反应的机制，为针对炎症反应的相关临床治疗与药物设计提供了新的靶点和思路。

关键词： Toll样受体 混合系蛋白激酶样结构域蛋白 TGF- β 激活激酶1

Abstract

Inflammation is a protective response by the body to ensure removal of detrimental stimuli, as well as a healing process for repairing damaged tissue. The innate immune system is the major contributor to the acute inflammation induced by microbial infection or tissue damage. However, the innate immune responses must be tightly controlled to avoid excessive inflammation and prevent unwanted damage toward the host. Toll-like receptors (TLRs) play important roles in recognizing PAMPs and eliciting innate immune responses. Thus, the negative regulation of TLR-induced responses is important for suppressing inflammation and deleterious immune responses. Here we report that mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) acts as a negative regulator of TLR signaling pathway to impair inflammation. MLKL has been revealed as a key signaling factor in tumor necrosis factor (TNF)-induced programmed necrosis. We found that in mouse embryonic fibroblast (MEF), MLKL deficiency significantly promoted LPS and poly I:C induced proinflammatory cytokines production as well as the activation of NF- κ B and MAPKs signaling pathways. Further studies showed that overexpression of MLKL attenuated the transcription activities of NF- κ B and AP-1, especially when these two transcription factors were activated by TGF- β -activated kinase 1 (TAK1). TAK1 is a key regulator in the signals transduced by Toll-like receptors and is required for NF- κ B and MAPK activation. We also proved that MLKL could interact with TAK1 and this interaction dynamically changed in response to LPS. In addition, MLKL promoted the degradation of TAK1. Our study reveals that, in addition to its function in necrosis, MLKL plays a role in the innate immune system. This finding reveals a novel mechanism by which the inflammation is negatively regulated and provides a new perspective for the exploration of pharmaceutical approaches against infectious and autoimmune diseases.

Keywords: Toll-like receptors; mixed lineage kinase domain-like protein; TGF- β -activated kinase 1

目录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
中文目录.....	III
英文目录.....	VI
第一章 前言	1
1.1 先天性免疫系统.....	1
1.1.1 概述	1
1.1.2 病原体相关分子模式和损伤相关分子模式	1
1.1.3 模式识别受体	2
1.2 Toll 样受体及其介导的信号通路.....	3
1.2.1 概述	3
1.2.2 Toll 样受体家族成员.....	4
1.2.3 Toll 样受体信号通路.....	5
1.2.4 Toll 样受体信号通路的负调控.....	8
1.2.5 Toll 样受体信号通路的效应分子.....	9
1.3 其他模式识别受体概述.....	10
1.3.1 RIG-I 样受体.....	10
1.3.2 NOD 样受体.....	10
1.3.3 胞质内 DNA 受体.....	11
1.4 细胞坏死与炎症.....	11
1.4.1 细胞坏死	11

1.4.2 细胞坏死在炎症中的作用	12
1.5 混合系蛋白激酶样结构域蛋白.....	13
1.6 立题背景.....	13
第二章 材料与方法	15
2.1 实验材料.....	15
2.1.1 哺乳动物细胞株	15
2.1.2 质粒	15
2.1.3 酶、试剂盒及主要试剂	15
2.1.4 抗体	15
2.1.5 Real-time 引物	16
2.2 实验方法.....	16
2.2.1 分子克隆相关实验和方法	16
2.2.2 细胞相关实验和方法	22
2.2.3 蛋白质相关实验和方法	24
2.2.4 RNA 相关实验和方法.....	26
2.3 数据分析.....	29
第三章 结果与分析	30
3.1 MLKL 抑制 LPS 和 poly I:C 激活的 TLR 信号通路.....	30
3.1.1 MEF 中 MLKL 缺失导致 LPS 和 poly I:C 介导产生的细胞因子显著增加	30
3.1.2 在 MLKL ^{-/-} MEF 中重建 mlkl 能抑制 LPS 和 poly I:C 介导的细胞因子的产生	32
3.1.3 MLKL 对于 MEF 中 LPS 和 poly I:C 诱导的 NF- κ B 和 MAPK 通路的活化起到负调控作用	34
3.2 MLKL 对 TLR 信号通路的抑制作用与其细胞坏死的功能没有关系.....	36

3.2.1 在 MLKL ^{-/-} MEF 细胞中重建没有坏死功能的 MLKL 能抑制细胞因子的产生	36
3.2.2 MEF 中 RIP3 对 LPS 和 poly I:C 介导产生的细胞因子没有影响.....	38
3.3 过表达 MLKL 可以抑制 TRIF 及其下游介导的 NF-κB 与 AP-1 的活性	40
3.3.1 过表达 MLKL 可以抑制 TRIF、TRAF6、TAK1/TAB1 介导的 NF- κ B 的活性	40
3.3.2 过表达 MLKL 可以抑制 TAK1/TAB1 介导的 AP-1 的活性.....	40
3.3.3 过表达 MLKL 对 TAK1 下游蛋白介导的 NF- κ B 与 AP-1 的活性没有影响	41
3.4 MLKL 与 TAK1 相互作用并降低 TAK1 的蛋白稳定性	43
3.4.1 MLKL 与 TAK1 发生相互作用.....	43
3.4.2 MLKL 降低 TAK1 的稳定性.....	44
3.5 总结与讨论.....	46
附录 1 图表索引	49
附录 2 缩略语及中英文对照	51
参考文献.....	53
致谢.....	60

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Table of Contents	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Innate immune system	1
1.1.1 Overview	1
1.1.2 PAMPs and DAMPs	1
1.1.3 Pattern recognition receptors	2
1.2 Toll-like receptors and its signaling pathway	3
1.2.1 Overview	3
1.2.2 Toll-like receptors and their ligands	4
1.2.3 Toll-like receptors Signaling Pathways	5
1.2.4 Negative regulation of Toll-like receptor signaling	8
1.2.5 Effectors of Toll-like receptor signaling	9
1.3 PRRs other than TLRs	10
1.3.1 The RLR Signaling Pathways.....	10
1.3.2 The NLR Signaling Pathways	10
1.3.3 Recognition of cytoplasmic DNA	11
1.4 Necrosis and inflammation	11
1.4.1 Necrosis	11
1.4.2 The role of Necrosis in inflammation.....	12

1.5	Mixed lineage kinase domain-like protein	13
1.6	Background.....	13
Chapter 2	Materials and Methods	15
2.1	Materials	15
2.1.1	Cell lines	15
2.1.2	Plasmids.....	15
2.1.3	Enzymes and major reagents	15
2.1.4	Antibodies.....	15
2.1.5	Real-time primers	16
2.2	Methods.....	16
2.2.1	Molecular cloning relative experiments and methods.....	16
2.2.2	Experiments and methods for cell	22
2.2.3	Experiments and methods for protein.....	24
2.2.4	Experiments and methods for RNA.....	26
2.3	Data exploitation	29
Chapter 3	Results and Discussions	30
3.1	MLKL limits LPS and polyI:C induced TLR signaling pathway	30
3.1.1	MLKL deficiency leads to accumulation of proinflammatory cytokines induced by LPS and poly I:C.....	30
3.1.2	Reconstitution of MLKL to MLKL ^{-/-} MEF impairs LPS poly I:C induced proinflammatory cytokines production	32
3.1.3	MLKL impairs the activation of NF- κ B and MAPK signaling pathway upon LPS or poly I:C treatment.....	34
3.2	Necrosis mediated by MLKL and RIP3 has no function on TLR signaling pathway.....	36
3.2.1	Reconstitution of Flag-MLKL to MLKL ^{-/-} MEF impairs LPS and poly I:C induced cytokines production and NF- κ B activation	36

3.2.2	RIP3 deficiency in MEF does not influence the proinflammatory cytokines production induced by LPS and poly I:C	38
3.3	MLKL suppresses NF-κB and AP-1 luc reporter activation activated by proteins downstream of TRIF	40
3.3.1	MLKL suppresses TRIF/TRAF6/TAK1-TAB1 mediated NF- κ B luc reporter activation.....	40
3.3.2	MLKL suppresses TAK1/TAB1 mediated AP-1 Luc reporter activation	40
3.3.3	MLKL does not influence NF- κ B and AP-1 luc reporter activation activated by proteins downstream of TAK1	41
3.4	MLKL interacts with TAK1 and improves its degradation.....	43
3.4.1	MLKL interacts with TAK1	43
3.4.2	MLKL lowers Tak1 protein level	44
3.5	Conclusions and discussion	46
Appendix 1	Index of figures and tables	49
Appendix 2	Abbreviations	51
References		53
Acknowledgement		60

第一章 前言

1.1 先天性免疫系统

1.1.1 概述

炎症是机体清除有害刺激时做出的保护性反应，同时也是修复受损组织的一个过程。先天性免疫对微生物感染、组织损伤等造成的炎症起到了重要作用。同时，先天性免疫也对获得性免疫的激活至关重要^[1]。

先天性免疫是宿主抵御病原体入侵的第一道防线。除了巨噬细胞、树突状细胞等免疫细胞能在自身免疫中发挥重要作用之外，其他类型的细胞，包括上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞等也参与到自身免疫的过程中。在这些细胞中，模式识别受体（pattern recognition receptors, PRRs）可以通过识别微生物的保守结构来检测到这些微生物的入侵。这些保守结构被称为病原体相关分子模式（pathogen-associated molecular patterns, PAMPs）。另外，PRR 还可以识别由受损伤的细胞释放的内源性小分子，这些小分子被称为损伤相关分子模式（Damage-associated molecular patterns, DAMPs）^[2]。

1.1.2 病原体相关分子模式和损伤相关分子模式

病原体相关分子模式（Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs）是细菌、病毒、真菌等入侵的微生物上存在的保守的、与机体完全不同的结构成分。PAMPs 大致可以分为（1）脂类化合物，例如细菌细胞壁中的组成成分如脂多糖（Lipopolysaccharides, LPS）、脂磷壁酸等；（2）多糖，如存在于微生物细胞壁上的肽聚糖等；（3）蛋白质或多肽，如存在于细菌胞膜上的脂蛋白、脂多肽、鞭毛蛋白以及病毒衣壳上的衣壳蛋白和融合蛋白；（4）核酸，包括微生物的 DNA 或 RNA 等遗传物质；（5）微生物小分子代谢物^[3]。

损伤相关分子模式（damage-associated molecular patterns, DAMPs）是一些由受到特定刺激的细胞释放出胞外的小分子。DAMPs 可以与 PRRs 结合从而激活

炎症反应。大多数 DAMPs 是细胞核内或者胞质内具有特定生理功能的蛋白质，在从还原环境转移到氧化环境后失去其正常的生理功能^[4]。另外，在细胞发生坏死之后，细胞核内的 DNA 会释放到细胞核外甚至细胞外而成为 DAMPs。蛋白质类的 DAMPs 包括热激蛋白和高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1, HMGB1) 等。非蛋白质类的 DAMPs 包括 ATP、尿酸、硫酸肝素和核酸等^[5]。

1.1.3 模式识别受体

目前,已经有四个 PRR 的家族得到鉴定,分别是 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)、C 型凝集素受体 (C-type lectin receptors, CLRs)、RIG-I 样受体 (RIG-I like receptors, RLRs) 以及 NOD 样受体 (NOD-like receptors, NLRs) ^[1]。

在识别 PAMP 之后, PRR 能上调一系列参与到炎症反应过程中的基因的转录。这些基因编码了促炎症细胞因子 (Proinflammatory cytokine)、I 型干扰素 (Type I interferon, Type I IFN)、趋化因子以及其他参与到 PRR 信号通路调节中的蛋白分子。

促炎症细胞因子包括肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白介素 (interleukin, IL) -1 和白介素 6 等。这些细胞因子被称为“促炎症”的原因是这些小分子在炎症过程中被诱导表达,并具有加强炎症反应的作用。这些细胞因子控制了炎症反应的过程,具有调节炎症组织的细胞死亡、改变血管内皮通透性、招募血细胞到炎症组织等多方面的功能。这些调节功能一般都由一系列基因共同参与协同完成的。例如,白介素和肿瘤坏死因子可以促进内皮细胞的粘附性,因此这些细胞因子可以使白细胞在迁移到炎症组织之后与组织表面紧密结合。不论是被感染、外伤或者毒素诱导激活,这两类细胞因子都可以通过开启一系列炎症调节因子的活性作用在内皮细胞上,从而达到调节炎症反应的功能^[6]。

I 型干扰素也参与到了炎症反应的调控中。I 型干扰素在细胞抗病毒过程中发挥着重要作用,它能帮助细胞清除入侵的病毒、启动获得性免疫、并激活造血干细胞的再生。I 型干扰素由 IFN- α 和 IFN- β 两个家族组成,可以由包括淋巴细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、上皮细胞等许多类型的细胞分泌。I 型干扰素在受到转录因子调控基因的转录后,产生的干扰素能够结合具有同源结构的 I 型干扰素受体,激活下游的 JAK-STAT 信号通路,从而产生 ISGF3 转录因子,诱导上百

种 IFN 诱导基因 (IFN-inducible genes, ISGs) 的表达。这些基因的表达产物包括 IRFs、PKR、IP10、ISG15 以及 OAS, 它们能够抑制病毒的复制、清除被病毒感染的细胞, 从而起到抗病毒的作用^[7]。

1.2 Toll 样受体及其介导的信号通路

1.2.1 概述

1996 年, 果蝇中的 Toll 蛋白被首次证明在真菌感染时参与到自身免疫反应中。紧接着, 许多同源的 Toll 蛋白在哺乳动物中被发现。这些蛋白被命名为 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs), 能够识别 PAMPs 并激活自身免疫反应^[1]。TLRs 是一个单次跨膜的蛋白, 在结构上由跨膜区、胞浆区和胞外区三部分组成。N 端的胞外结构域是富含亮氨酸重复序列 (leucine-rich repeats, LRRs), 可以识别特定病原体的成分。C 端的胞内结构域被称为 Toll/IL-1 受体 (Toll/IL-1 receptor, TIR) 结构域, 负责激活下游的信号^[8]。

目前已知的 TLR 家族由超过 13 个成员组成, 每一个成员都可以感知病毒、细菌、真菌等不同病原体的 PAMPs^[1] (见图 1.1)。TLRs 在巨噬细胞、树突状细胞、B 细胞、嗜中性粒细胞等免疫细胞中表达, 也在成纤维细胞、上皮细胞和角质细胞中表达。在识别 PAMPs 之后, TLRs 的 TIR 结构域结合其他含有同源的 TIR 结构域的接头蛋白, 通过激活一系列信号级联反应活化转录因子, 诱导促炎症因子、趋化因子等的产生。TLRs 识别 PAMPs 的过程不仅对炎症反应的激活非常重要, 还在病原体作用下的获得性免疫过程中发挥了作用^[8]。

TLRs 根据细胞内定位和识别的 PAMP 的种类大致可以分为两个亚家族。一个包括 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 和 TLR11, 这些受体分布在细胞膜上, 主要识别微生物的膜成分, 例如脂类、脂蛋白和蛋白质等。另一个亚家族包括 TLR3、TLR7、TLR8 和 TLR9, 这些受体主要分布在细胞内的膜结构上, 例如内质网、内体和溶酶体膜上, 主要识别微生物的核酸结构。能够识别核酸分子的 TLRs 会从内质网被招募到内吞溶酶体, 从而被相应的配体激活。这个招募过程的具体机制还不清楚^[9]。

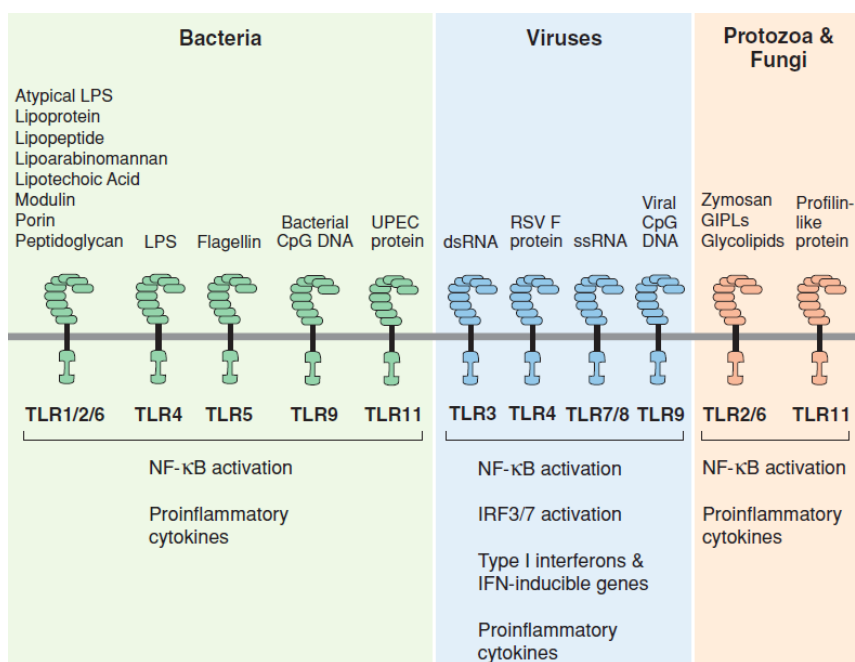


图 1.1 Toll 样受体家族成员及其配体

Fig 1.1 The family members of TLRs and their ligands

(from Sankar Ghosh, 2006)

1.2.2 Toll 样受体家族成员

TLR2 可以识别细菌、类菌质体、真菌和病毒等多种结构成分，其中包括细菌和类菌质体的脂蛋白。TLR2 通过与 TLR1 或者 TLR6 形成异源二聚体来识别其配体。TLR2、TLR1 和 TLR6 的胞外结构域的晶体结构表明它们能形成 M 型结构，而它们的同源配体可以结合在 TLR1/TLR2 或者 TLR6/TLR2 异源二聚体形成的内部的口袋里^[10,11]。在 TLR2 的配体的刺激下，不同的细胞会有不同的免疫反应，如产生促炎症细胞因子或者 I 型干扰素。

TLR4 与 MD2 共同作用在细胞表面识别脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)。LPS 是革兰氏阴性菌外膜的一个组成成分。TLR4、MD2 和 LPS 形成的复合体的晶体结构显示，两个 TLR4-MD2-LPS 复合体对称地相互结合形成一个同源二聚体^[12]。TLR4 还能与病毒衣壳蛋白结合识别病毒的入侵。另外，TLR4 还可以调控 H5N1 禽流感感染的病理过程，其识别机制与病毒本身无关，而是通过一个内源性的 DAMP^[13]。

TLR5 在小肠固有层中的树突状细胞中高表达，在那里它可以识别细菌的鞭

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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 for delivery details.

廈門大學博